

UNTERSUCHUNGEN
ZUR MÖGLICHKEIT
EINER IMMUNISIERUNG
GEGEN MYKOTOXINE
AM BEISPIEL VON T2-TOXIN
UND DIACETOXYSCIRPENOL

Michael Böhm

Disbui. München

1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Milch
(Lehrstuhl: Professor Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

UNTERSUCHUNGEN ZUR MÖGLICHKEIT EINER IMMUNISIERUNG GEGEN
MYKOTOXINE AM BEISPIEL VON T2-TOXIN UND DIACETOXYSCIRPENOL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Michael Böhm
aus
Würzburg

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker
Referent: Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent: Prof. Dr. H.K. Dennig

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCKFRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Schrifttum	2
2.1 Trichothecene, insbesondere T2-Toxin und Diacetoxyscirpenol (DAS)	2
2.1.1 Allgemeines	2
2.1.2 Bildung und Vorkommen	2
2.1.3 Biologische Eigenschaften	4
2.1.4 Nachweismethoden	9
2.2 Immunisierung gegen niedermolekulare Toxine	10
3 Eigene Untersuchungen	12
3.1 Aktive Immunisierung	12
3.1.1 Material	12
3.1.2 Methodik	13
3.1.2.1 Antigenherstellung	13
3.1.2.1.1 Herstellung eines zur Kopplung befähigten Toxin-derivates	13
3.1.2.1.2 Kopplung der Toxinderivate an ein Trägerprotein	14
3.1.2.1.3 Verwendung eines kommerziell verfügbaren T2-Toxin-Konjugates	14
3.1.2.2 Immunisierung von Versuchstieren	14
3.1.2.2.1 Vorversuche zur Ermittlung der Impfdosis	14
3.1.2.2.2 Immunisierung von Meerschweinchen	15
3.1.2.2.3 Immunisierung von Mäusen	20
3.1.2.3 Antikörpernachweis	20
3.1.2.3.1 Aufbereitung der anti-Toxin-Antiseren	20
3.1.2.3.2 Enzymmarkierung der Toxine mittels Carbodiimid-Methode	21
3.1.2.3.3 Enzymmarkierung der Toxine mittels gemischter Anhydrid-Methode	21
3.1.2.3.4 Ermittlung der optimalen Verdünnung des Toxin-Peroxidase-Konjugates	22
3.1.2.3.5 Antikörpernachweis mittels indirektem ELISA	22
3.1.2.3.6 Antikörpernachweis mittels direktem ELISA	24

3.1.2.3.7	Nachweis der toxinbindenden Wirkung der Antikörper	25
3.1.2.4	Belastungsversuche	26
3.1.2.4.1	Applikation der Toxine	26
3.1.2.4.2	Beobachtung der Tiere	29
3.1.3	Ergebnisse	30
3.2	Passive Immunisierung	53
3.2.1	Material	53
3.2.2	Methodik	53
3.2.2.1	Immunisierung von Kaninchen	54
3.2.2.2	Antikörpernachweis mittels direktem ELISA	54
3.2.2.3	Belastungsversuche	54
3.2.2.3.1	Applikation von heterologem Antiserum und T2-Toxin	54
3.2.2.3.2	Applikation von homologem Antiserum und T2-Toxin	55
3.2.2.3.3	Beobachtung der Tiere	56
3.2.3	Ergebnisse	57
4	Diskussion	63
5	Zusammenfassung/Summary	70
6	Literatur	74

1 Einleitung

Mykotoxine sind Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die bereits in geringen Mengen bei Mensch und Tier Schäden verursachen können. Nachdem zunächst die Gruppe der Aflatoxine, die sich als äußerst toxisch und kanzerogen erwies, im Vordergrund der Untersuchungen über Mykotoxine stand, haben in den letzten Jahren vornehmlich die Trichothecene immer mehr an Bedeutung gewonnen. Zu letzteren zählen auch T2-Toxin und Diacetoxyscirpenol (DAS). Am Lehrstuhl werden seit einigen Jahren Antiseren zum Nachweis von Mykotoxinen in Milch- und Milchprodukten bzw. im Futter von Milchtieren entwickelt. Da einerseits die entsprechenden Antigene und Antiseren verfügbar waren, andererseits immer häufiger über durch Mykotoxine verursachte Schäden in landwirtschaftlichen Tierbeständen berichtet wird, boten sich Untersuchungen über die Möglichkeit einer Immunisierung zum Schutz gegen diese Stoffe an.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte am Beispiel von T2-Toxin und DAS untersucht werden, inwieweit durch aktive bzw. passive Immunisierung gegen diese Toxine ein Schutz der Versuchstiere erzielt werden kann. Da aber sowohl T2-Toxin als auch DAS selbst nicht antigen wirksam sind, mußten sie erst in Derivate überführt und an ein Trägerprotein gebunden werden. Mit dem so synthetisierten Antigen (im Versuchsverlauf konnte später ein bereits synthetisiertes T2-Toxin-Protein-Konjugat käuflich erworben werden) sollten Versuchstiere einerseits aktiv immunisiert, andererseits von aktiv immunisierten Tieren Antiseren zur passiven Immunisierung gewonnen werden. Beide Gruppen sollten anschließend einem Belastungstest unterzogen werden. Für die in vitro Kontrolle des Immunisierungserfolges mußte ein enzym-immunologisches Verfahren erarbeitet werden.

2 Schrifttum

2.1 Trichothecene, insbesondere T2-Toxin und Diacetoxy-scirpenol (DAS)

2.1.1 Allgemeines

Die eigentliche Erforschung der Mykotoxine begann etwa ab 1960 mit der Beschreibung der Aflatoxine und hat seitdem zunehmend an Bedeutung gewonnen. Nachdem die äußerst toxischen und kanzerogenen Eigenschaften der Aflatoxine erkannt worden waren, wurden die Nachweismethoden für diese Toxingruppe stetig verbessert und auch andere Schimmelpilzgifte in die Untersuchungen einbezogen. Von besonderem Interesse ist dabei die Gruppe der Trichothecene, sekundäre Stoffwechselprodukte von Fusarien, die auf Getreide parasitieren.

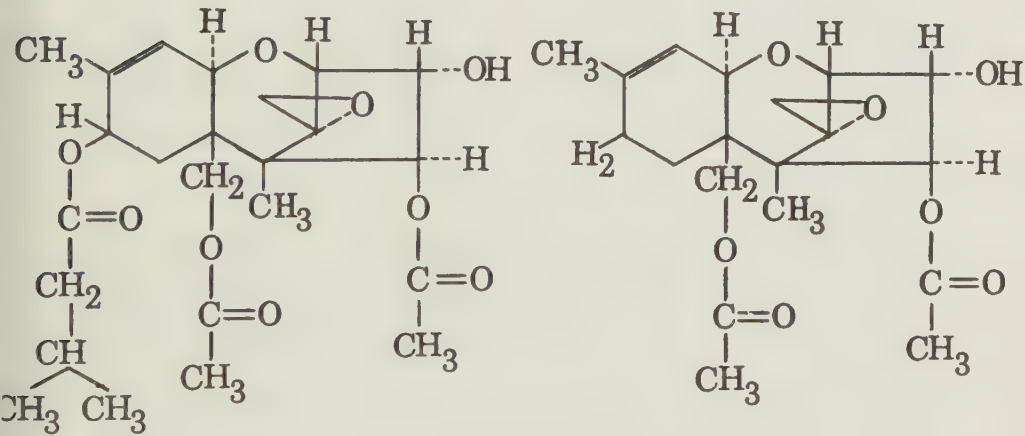
Die Forschungsschwerpunkte lagen bisher auf dem toxikologischen und analytischen Sektor. Die erheblichen Fortschritte in der Immunologie lassen es als möglich erscheinen, durch Immunisierung einen wirkungsvollen Schutz gegen diese Toxine zu erreichen. Diese Problematik ist bisher in der Literatur noch nicht berücksichtigt.

2.1.2 Bildung und Vorkommen

Die Trichothecene T2-Toxin und DAS sind Stoffwechselprodukte verschiedener Fusarienarten, z.B. *Fusarium tricinctum*, *Fusarium solani* und *Fusarium roseum* (SMALLEY und STRONG, 1974; UENO, 1977) die als Pflanzensaprophyten und -parasiten auf der ganzen Welt verbreitet sind. Nach UENO (1977) ist jeder Fusarienstamm in der Lage, abhängig von äußeren Faktoren, wie Temperatur und Feuchtigkeit, unterschiedliche Toxine zu bilden. So produziert z.B. Fusa-

rium tricinatum T2-Toxin und DAS (BAMBURG, 1969; MIROCHA, 1976). Die Fusarienarten wachsen auch noch bei sehr niedrigen Temperaturen (ELLISON, 1973) und ihre Stoffwechselprodukte sind stabil gegenüber Umwelteinflüssen (SMALLEY und STRONG, 1974). Ihre sekundäre toxische Wirkung bei Mensch und Tier wird vorwiegend durch Aufnahme von verschimmelten Getreideprodukten verursacht (PALTI, 1978).

Ihrer chemischen Struktur nach sind T2-Toxin und DAS einfache Sesquiterpenoide und gehören zu den Trichothecen (UENO, 1977) (Abb. 1).



T2-Toxin

Diacetoxyscirpenol

Abb. 1: Chemische Strukturformeln



2.1.3 Biologische Eigenschaften

Akute und subakute Vergiftungserscheinungen durch Trichothecene können bei Mensch und Tier nach Aufnahme schimmeligem Getreideprodukten beobachtet werden. Übersichten über die LD_{50} -Werte von T2-Toxin und DAS enthalten die Tabellen 1 und 2.

Tabelle 1: LD_{50} -Werte für T2-Toxin

TIERART	APPL. DOSIS mg/kg/KGW	AUTOR
Meerschweinchen	oral 3,06	DE NICOLA et al. (1978)
Meerschweinchen	oral 2,52	KRIEGLEDER (1980)
Ratte	oral 3,8	KOSURI et al. (1971)
Ratte	oral 4,0	BAMBURG et al. (1969)
Taube	oral 2,75	ELLISON u. KOTSONIS (1973)
Regenbogenforelle	oral 6,1	MARASAS et al. (1967)
1-Tage-Küken	oral 5,25(+0,21)	CHI et al. (1977b)
Legehennen	oral 6,27(+0,42)	CHI et al. (1977b)
Maus	i.p. 5,2	UENO et al. (1972a)
Maus	i.p. 3,04(+0,14)	YATES et al. (1968)
Schwein	i.v. 1,21(+0,15)	WEAVER et al. (1978b)

Tabelle 2: LD₅₀-Werte für DAS

TIERART	APPL. DOSIS mg/kg/KGW	AUTOR
Kaninchen	i.v. 1,0	STÄHELIN et al. (1968)
Meerschweinchen	oral 2,14	KRIEGLEDER (1980)
Meerschweinchen	oral 1,0 - 2,0	MIROCHA et al. (1976)
Ratte	oral 7,3	BRIAN et al. (1961)
Ratte	i.v. 1,3	STÄHELIN et al. (1968)
Ratte	i.p. 0,75	BRIAN et al. (1961)
Maus	i.v. 10,0	LOEFFLER et al. (1964)
Maus	i.v. 12,0	STÄHELIN et al. (1968)
Maus	i.p. 23,0	UENO et al. (1972a)
Hund	i.v. 1,1	STÄHELIN et al. (1968)
Schwein	i.v. 0,376(+0,043)	WEAVER et al. (1978)
1-Tage-Küken	oral 3,82 (+0,40)	CHI et al. (1978b)

Nach UENO et al. (1970) besitzt das Meerschweinchen unter den Versuchstieren die höchste Sensibilität gegenüber den Trichothecen. Das Geschlecht spielt offenbar in der Empfindlichkeit keine Rolle (UENO, 1977).

Die orale Aufnahme von T2-Toxin mit dem Futter erzeugte bei Küken gelblich-weiße Läsionen im Schnabel sowie eine Zunahme der Bakterien in der Schnabelhöhle, hauptsächlich Staph. epidermidis und E. coli (WYATT, 1972). Diese Schnabelläsionen wurden von CHI et al. (1978a) auch nach der Aufnahme von DAS bei Küken beobachtet. Ferner konnte bei Geflügel nach oraler Verabreichung von T2-Toxin Inappetenz (SPEERS et al., 1977), geringe Gewichtszunahme (WYATT et al., 1973a) und Kachexie (PALYUSIK und KOPLIKNÉ-KOVÁCS, 1976) festgestellt werden. WYATT et al. (1973b) beschrieben zudem eine abnorme Flügelhaltung und Exzita-

tionen bei Küken, denen T2-Toxin gefüttert wurde. Tauben, die T2-Toxin über das Futter erhielten, erbrachen des öfteren (PRENTICE und DICKSON, 1968; ELLISON und KOTSONIS, 1973), ebenso Katzen, denen das Toxin oral verabreicht wurde (YAGEN et al., 1977). PRENTICE und DICKSON (1968) konnten dies auch für Hund und Schwein nach Aufnahme von Futtermitteln aufzeigen, die Kulturen von *Fusarium roseum* enthielten. T2-Toxin bewirkte bei Ratten Bewegungsstörungen und blutigen Durchfall (KOSURI et al. 1971). MATTHEWS et al. (1977) konnten mit T2-Toxin jedoch kein hämorrhagisches Syndrom bei Kälbern hervorrufen. Blutigen Kotabsatz bei Kühen nach Aufnahme von T2-Toxin und ein hämorrhagisches Darmsyndrom beim Schwein nach der oralen Verabreichung von DAS wurden von MIROCHA et al. (1976) beschrieben. Pathologisch-anatomisch stellten DE NICOLA et al. (1978) bei Meerschweinchen, die nach oraler Applikation von T2-Toxin verendeten, folgendes fest: Blutungen und Hyperämie der Magenschleimhaut, wobei teilweise das Caecum mitbetroffen war, Magendilatation, Hyperämie der Nebennieren und Oedematisierung der Mesenteriallymphknoten. Histologisch zeigten sich in der Schleimhaut des Magen-Darm-Traktes Epithelnekrosen, Ulzerationen und Blutungen. Desweiteren beschrieben sie Nekrosen in den kortikalen Follikeln der Lymphknoten sowie eine diffus verteilte Nekrose im Knochenmark. Von UENO et al. (1972b) wurden Karyorrhesis in Thymus, Knochenmark und Darmmucosa beobachtet. Eine Atrophie der Bursa fabricii tritt bei Küken nach oraler Applikation von T2-Toxin auf (WYATT et al., 1972). Schleimhautnekrosen in Kropf und Muskelmagen beschrieben CHI et al. (1977b) in Versuchen mit Küken und Legehennen, denen letale Dosen von T2-Toxin oral verabreicht wurden. KRIEGLEDER (1980) beschrieb die identischen morphologischen Veränderungen bei Meerschweinchen, die letale Dosen von T2-Toxin bzw. DAS erhielten, wie folgt: Blutungen in der Schleimhaut des Magens und Caecums, Magendilatation, fleckige Hyperämie der Milz. Histologisch stellte er Nekrosen in den Lymphorganen sowie im Knochenmark und in den Oberflächen- und Kryptenepithelien der Schleimhaut des gesamten Magen-Darm-Traktes

fest. Bereits geringe T2-Toxinmengen reichen bei Forellen aus, um eine Darmschleimhautablösung hervorzurufen (MARASAS et al., 1969). Bei Katzen führte T2-Toxin, oral verabreicht, zu Blutungen und Nekrosen der Darmschleimhaut (LUTSKY et al., 1978). YAGEN et al. (1977) berichten über eine hämorrhagische Diathese im Darm und vergrößerte hämorrhagische Darmlymphknoten beim Meerschweinchen. Wiederholte orale subletale T2-Toxin-Gaben konnten bei Meerschweinchen (DE NICOLA et al., 1978; KRIEGLEDER, 1980), Affen (JAGADEESAN et al., 1982), Katzen (LUTSKY et al., 1978; YAGEN et al., 1977) und Mäusen (OHTSUBO und SAITO, 1977) Leukopenie und Lymphozytose (DE NICOLA et al., 1978) erzeugen.

Katzen zeigten nach subkutaner T2-Toxin-Applikation Erbrechen, Ataxie der Hinterbeine und eine hochgradige Leukopenie (SATO et al., 1975). Bei Ratten tritt nach kutaner Verabreichung von T2-Toxin innerhalb weniger Stunden eine ausgedehnte Entzündung der Haut bis hin zur Ablösung der oberen Hautschicht auf (MARASAS et al., 1969). Bei Meerschweinchen stellten sich nach subkutaner DAS-Applikation Nekrosen in allen Hautschichten ein, wobei diese Tierart eine höhere Empfindlichkeit als Mäuse und Kaninchen aufwies (UENO et al., 1970). Ähnliche Hautreaktionen demonstrierten STÄHELIN et al. (1968) bei Ratten und Hunden nach subkutaner Gabe von Trichothecenen. Bei der Sektion der verendeten Tiere stellten SATO et al. (1975) nach subkutaner T2-Toxin-Applikation ausgedehnte Schleimhautnekrosen in Dünn- und Dickdarm, sowie eine deutliche Karyorrhexis in den Germinalzentren der Milzfollikel und Lymphknoten fest. Im subakuten Versuch beschrieben sie eine Atrophie von Thymus, Milz, Lymphknoten und Knochenmark sowie größere Blutungen in den Meningen, Lungen und eine Degeneration der Nierentubuli.

Intravenöse Applikation von DAS (STÄHELIN et al., 1968) führte bei Katzen, Hunden, Kaninchen und Mäusen zu Apathie, verlang-

samter Atmung, Diarrhoe, Erbrechen, Tremor und Tachykardie. Ratten reagierten im chronischen Versuch mit Gewichtabnahme, Hämaturie, Diarrhoe, Leukopenie und Anämie (STÄHELIN et al., 1968). WEAVER et al. (1978a,b) berichteten von Erbrechen beim Schwein ca. 20 min nach intravenöser T2-Toxin- bzw. DAS-Applikation. Auch STÄHELIN et al. (1968) stellten in ihren Untersuchungen fest, daß Hunde nach jeder Injektion wiederholt erbrachen, ELLISON und KOTSONIS (1973) bestätigten dies auch bei Tauben. Nach intravenösen T2-Toxin- bzw. DAS-Gaben wurden beim Schwein Bewegungsstörungen und Hinterhandpareesen beobachtet (WEAVER et al. 1978a). Pathologisch-anatomisch lag bei den Schweinen, die infolge einer einmaligen T2-Toxin-Dosis gestorben waren, eine Hyperämie der Meningengefäße vor. Histologisch konnten in der Schleimhaut von Jejunum und Ileum eine starke Hyperämie sowie eine Nekrobiose im Oberflächen- und Kryptenepithel festgestellt werden. In den Germinalzentren der Mesenteriallymphknoten lagen Kernpyknose und Karyorrhexis vor. Durch intravenöse DAS-Applikation wurden ähnliche Veränderungen hervorgerufen (WEAVER et al. 1978a,b).

Eine 4-wöchige intravenöse Applikation von DAS erzeugte bei Ratten blutige Darmschleimhaut, histologisch konnten Herdnekrosen in der Leber, Gallengangsproliferationen, Hypoplasie der Milzfollikel, Proliferation der retikuloendothelialen Zellen und im Hoden eine Tubulusatrophie mit blockierter Spermatogenese gefunden werden (STÄHELIN et al., 1968).

UENO et al. (1972a) beschrieben bei der Maus nach intraperitonealer Applikation von T2-Toxin Blutungen in der Darmschleimhaut und eine Thymusatrophie. Letzteres stellten auch ROSENSTEIN et al. (1978) nach intraperitonealer DAS-Verabreichung bei Mäusen fest. Histologisch wurden nach intraperitonealer T2-Toxin-Injektion eine Schädigung der teilungsaktiven Zellen von Thymus, Dünndarm, Knochenmark, Milz und Lymphknoten beschrieben (UENO et al., 1972a). Eine Zellzerstörung in der Cortex des Thymus wurde von ROSENSTEIN et al. (1978) bei Mäusen festge-

stellt, denen über 5 Tage T2-Toxin bzw. DAS intraperitoneal verabreicht worden war.

2.1.4 Nachweismethoden

Der Nachweis von T2-Toxin und DAS kann mit Hilfe physikalisch-chemischer Methoden, durch biologische Verfahren sowie durch Kombination beider Methoden erfolgen und seit einigen Jahren auch durch serologische Verfahren.

Wegen des geringen technischen Aufwandes wird sehr oft die Dünnschichtchromatographie angewandt, um Mykotoxine unter Ausnutzung ihrer chem./phys. Merkmale nachzuweisen. T2-Toxin und DAS besitzen keine fluoreszierenden Eigenschaften, noch zeigen sie eine verwertbare Absorption im sichtbaren oder UV-Bereich. Sie werden deshalb chemisch in fluoreszierende Stoffe umgewandelt, dazu eignen sich Schwefelsäure, p-Anisaldehyd und p-Methyl-Benzanillin, die als Sprühreagenzien auf die Kieselgelschicht des Dünnschichtchromatogramms aufgebracht werden (GIMENO et al., 1982). Als Laufmittel wurde von SCHULTZ und MOTZ (1983) Chloroform-Methanol (95 + 5) eingesetzt, das sich für die Trennung von T2-Toxin und DAS von Störsubstanzen am geeignetsten erwies.

Zum biologischen Nachweis von Trichothecenen sind vor allem der Kaninchenhauttest (JOFFE, 1960), der Hühnerembryonentest (BEHRINGER, 1972), Tests mit Erbsensämlingen (BAMBURG et al., 1971; BRIAN et al., 1961) und der Test mit Kaninchenretikulozyten (UENO et al., 1969) zu erwähnen. Auch Pollen vom Ziertabak (*Nicotiana glauca*) eignen sich zum Nachweis von T2-Toxin und DAS, weil diese Toxine eine Keimhemmung hervorrufen (SIRIWARDANA et al., 1978; SCHULTZ und MOTZ, 1983). Die Hemmung der Proteinsynthese in Gewebekulturen als Nachweis für T2-Toxin beschrieben THOMPSON und WANNEMACHER (1984).

Bei den serologischen Nachweismethoden ist vor allem das "Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay"-Verfahren (ELISA) zu erwähnen. Um einen ELISA durchführen zu können, müssen spezifische, gegen das jeweilige nachzuweisende Toxin gerichtete Antikörper vorhanden sein. Um solche Antikörper zu gewinnen, müssen Mykotoxine als Haptene zunächst zu Antigenen synthetisiert und Versuchstieren appliziert werden. CHU et al. (1979) führten dazu T2-Toxin in ein Hemisuccinat über (T2-HS), das dann an bovines Serumalbumin (BSA) gekoppelt wurde (T2-HS-BSA). Das so hergestellte Antigen wurde anschließend intrakutan an Kaninchen verabreicht, die als Antikörperspender dienten. Für den enzymimmunologischen Nachweis ist u.a. außerdem die Synthese eines Toxin-Enzym-Konjugats erforderlich. Der Nachweis von T2-Toxin mittels ELISA wird u.a. von PESTKA et al. (1981), PETERS et al. (1982) und TITAN et al. (1984) beschrieben.

2.2 Immunisierung gegen niedermolekulare Toxine

Bisher diente die Immunisierung gegen niedermolekulare Toxine zur Gewinnung von Antikörpern gegen diese Stoffe, die in serologischen Nachweismethoden Verwendung fanden und nicht um eine Schutzwirkung beim immunisierten Tier gegen die Toxine zu erzielen. So beschrieben CHU et al. (1978) die Herstellung von Antikörpern gegen T2-Toxin folgendermaßen: T2-Toxin wurde in ein Hemisuccinat (T2-HS) überführt und die Umsetzung dünnschichtchromatographisch kontrolliert. Anschließend erfolgte die Bindung von T2-HS an ein Trägerprotein, in diesem Fall an bovines Rinderserumalbumin (T2-HS-BSA). Diese Methode wurde von CHU et al. (1976) schon für die Produktion von Antikörpern gegen Ochratoxin A sowie 1977 von CHU und UENO zur Antikörpergewinnung gegen Aflatoxin B₁ angewandt. Das so gewonnene Impfkongugat, z.B. T2-HS-BSA, wurde nach Reinigung in 0,9%iger Kochsalzlösung aufgenommen, mit komplettem Adjuvans emulgiert und intrakutan an mehreren Stellen Kaninchen appliziert. NIESCHLAG et al. (1974) beschreiben ebenfalls die multiple intradermale Applikation von

Antigenen, um Antiseren in Kaninchen zu produzieren. PESTKA et al. (1981) wandten diese Methode ebenfalls zur Herstellung von Antiserum gegen T2-Toxin an. Durch Reinigung der so gewonnenen Antiseren nach HEBERT et al. (1973), konnten diese im ELISA eingesetzt werden. Auch PETERS et al. (1982) lehnten sich für die Herstellung des Impfkongugates an die von CHU beschriebene Methode an, die Boosterung der Versuchstiere erfolgte in der 3., 6., 9. und 12. Woche nach der intrakutanen Grundimmunisierung. TITAN et al. (1984) immunisierten ebenfalls nach der Methode von CHU Kaninchen, um Antikörper gegenüber T2-Toxin zu erhalten. Eine Immunisierung von Kaninchen gegen Aflatoxin B₁ wird von BIERMANN (1980) beschrieben, wobei auch hier die gewonnenen Antiseren nur für den Nachweis von Aflatoxin B₁ mittels ELISA bestimmt waren. Märtlbauer und Terplan (1986) weisen auf die Notwendigkeit hin, für die Herstellung des Immunogens gegenüber derjenigen des Enzymkongugates eine unterschiedliche Kopplungsmethode anzuwenden.

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Aktive Immunisierung

3.1.1 Material

Die Mykotoxine DAS und T2-Toxin wurden als Reinsubstanzen von der Fa. SIGMA bezogen, ebenso das anti-Meerschweinchen-IgG-Peroxidase-Konjugat und das anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat. Während der eigenen Untersuchungen brachte die Fa. SIGMA ein T2-Toxin-BSA-Konjugat auf den Markt, das dann in den Versuchen zur Immunisierung ebenfalls eingesetzt wurde.

Die Chemikalien wurden von der Fa. MERCK in der Reinheitsstufe p.A. bezogen.

Als Versuchstiere wurden männliche Albinomeerschweinchen (Fa. IVANOVAS) mit Gewichten von 500 - 550 Gramm verwendet, ferner weibliche Albinomäuse von durchschnittlich 50 Gramm. Gehalten wurden die Tiere bei einer Standarddiät (Fa. ALTROMIN) und Wasser.

Die in der Arbeit wiederholt verwendeten Puffer sowie die Waschlösung hatten folgende Zusammensetzungen:

Phosphatpuffer (PBS), pH 7,0:

NaCl	0,116 mol/l
Na ₂ HPO ₄	0,01 mol/l
KH ₂ PO ₄	0,003 mol/l

Carbonat-Bicarbonat-Puffer, pH 9,6:

Na ₂ CO ₃	0,015 mol/l
NaHCO ₃	0,035 mol/l

Substratpuffer:

24,3 ml Citronensäure 0,1M
25,7 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2M
ad 100 ml Aqua dest.

Waschlösung (NaCl/TWEEN 20):

8,5 g NaCl
0,25 ml TWEEN 20
ad 1.000 ml Aqua dest.

Die Auswertung der im ELISA eingesetzten Mikrotiterplatten erfolgte durch einen ELISA-Autoreader der Fa. DYNATECH, Mod. 580, bei 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm).

3.1.2 Methodik

Insgesamt wurden 4 Versuchsabschnitte zur aktiven Immunisierung mit anschließenden Belastungstests durchgeführt. Für den ersten Versuch mußte aus den Mykotoxinen T2-Toxin und DAS durch Kopplung an ein Protein ein Vollantigen synthetisiert werden, um Versuchstiere gegen diese Toxine aktiv zu immunisieren. Später wurde für die Immunisierung gegen T2-Toxin ein käufliches Produkt (T2-BSA-Konjugat) der Fa. SIGMA eingesetzt.

3.1.2.1 Antigenherstellung

3.1.2.1.1 Herstellung eines zur Kopplung befähigten Toxin-Derivates

In Anlehnung an die Methode von CHU et al. (1979) wurden T2-Toxin bzw. DAS in Hemisuccinate überführt.

Dies geschah im Rahmen anderer Untersuchungen im Haus.

3.1.2.1.2 Kopplung der Toxinderivate an ein Trägerprotein

Um die erhaltenen Hemisuccinate T2-HS bzw. DAS-HS an ein Trägermolekül, hier Humanserumalbumin (HSA), zu binden, wurde ebenfalls die von CHU et al. (1979) beschriebene Methode angewandt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, sie dauerte 8 h, wobei der pH-Wert auf 6,5 gehalten wurde. Das Kopplungsprodukt wurde über eine Sephadex G50-Säule (fine) geschickt; eluiert wurde mit 0,9%iger NaCl. Der UV-Monitor registrierte zwei Peaks, von denen der zuerst eluierte die Eiweißfraktionen (T2-HS-HSA; DAS-HS-HSA) darstellte, während der zweite niedermolekulare Substanzen anzeigte. Nicht an HSA gebundenes T2-HS bzw. DAS-HS konnte auch dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden. Die Proteinbestimmung erfolgte nach LOWRY (1951), anschließend wurden die Eiweißfraktionen gepoolt und gefriergetrocknet (ESGIN, 1983).

3.1.2.1.3 Verwendung eines kommerziell verfügbaren T2-Toxin-Konjugates

Während der Untersuchungen zu dieser Arbeit brachte die Fa. SIGMA ein bereits synthetisiertes T2-Toxin-Konjugat (T2-HS-BSA; BSA = bovines Serumalbumin) auf den Markt, das später ebenfalls zur Immunisierung von Versuchstieren eingesetzt wurde.

3.1.2.2 Immunisierung von Versuchstieren

3.1.2.2.1 Vorversuche zur Ermittlung der Impfdosis

Da in der Literatur keine Beschreibung über die Immunisierung von Meerschweinchen gegenüber T2-Toxin (bzw. DAS) zu finden war, wurden in einem Vorversuch 5 Tiere mit unterschiedlichen Konzentrationen von T2-HS-HSA immunisiert (500 ng, 1.000 ng, 2.000 ng, 5.000 ng, 10.000 ng). Hierbei sollten evtl. lokale oder allgemeine Veränderungen am Tier beobachtet werden.

Für die weiteren Versuche wurde zunächst die Impfdosis von 10.000 ng T2-HS-HSA verwendet (Proteinbestimmung nach LOWRY), ebenso betrug die Impfdosis für die DAS-Gruppe 10.000 ng DAS-HS-HSA pro Tier. In den Versuchen 2 mit 4 wurde die Impfdosis auf 100 µg Toxin-HS-BSA pro Tier erhöht.

In einem weiteren Versuch wurde eine intranasale Applikation des Antigens bei 4 Meerschweinchen durchgeführt. Dazu wurde T2-HS-BSA in 0,9%iger NaCl gelöst und ohne Zusatz eines Adjuvans mittels einer Mikropipette direkt in die Nasenlöcher der narkotisierten Tiere verabreicht (pro Tier 100 µl Antigen-Lösung auf beide Nasenlöcher verteilt). Die Impfdosen betrugen 500 ng (Tier 1), 1.000 ng (Tier 2), 5.000 ng (Tier 3) und 10 µg (Tier 4) T2-HS-BSA. Im Abstand von jeweils 1 1/2 Wochen wurde bei den Tieren 4mal diese Verabreichung mit jeweils den entsprechenden Impfdosen wiederholt, wobei auch Blut abgenommen wurde (aus der cranialen Hohlvene). Nach dem Fällen der Seren (siehe 3.1.2.3.1) wurden diese zur Antikörpertiterbestimmung mit T2-HS-HRP titriert.

3.1.2.2.2 Immunisierung von Meerschweinchen

Versuch 1:

Es wurden 12 Meerschweinchen (Tiere A1 mit A12) nach der Methode von NIESCHLAG (1974) immunisiert. Pro Tier wurden 10.000 ng T2-HS-HSA in 0,25 ml 0,9%iger NaCl und 0,75 ml komplettem Freund'schen Adjuvans (Fa. DIFCO) emulgiert. Die Emulsion wurde den am Rücken geschorenen Meerschweinchen, auf 18 - 25 Stellen verteilt, intrakutan appliziert. Nach 4 Wochen wurden den narkotisierten Tieren aus der cranialen Hohlvene jeweils ca. 4 ml Blut entnommen. Diese Blutproben wurden zur Gerinnung 2 h ins Wasserbad (37°C) gestellt, anschließend über Nacht bei 4°C gelagert und am nächsten Tag zweimal 20 min bei 3.000 U/min zentrifugiert. Nach der Serumauflagerung (siehe 3.1.2.3.1) wurde deren Gehalt an spezifischen Antikörpern gemessen. Die Tiere wurden in der 6., 9. und 12. Woche subkutan mit jeweils 10 µg

T2-HS-HSA restimuliert, wobei auch hier das Impfkongugat in 0,25 ml 0,9%iger NaCl und 0,75 ml komplettem Freund'schen Adjuvans emulgiert war. Jeweils 1 Woche nach den Restimulierungen wurden in der oben beschriebenen Art pro Tier ca. 4 ml Blut entnommen und die Seren gewonnen.

In gleicher Weise wurden 12 Meerschweinchen (Tiere A15 mit A26) gegenüber DAS immunisiert und ebenfalls in der 6., 9. und 12. Woche subkutan restimuliert. Die Blutentnahme und die Serumgewinnung erfolgte analog.

Versuch 2:

In diesem zweiten Versuch sollte der Nachweis der Antikörper im direkten ELISA mittels eines Enzymkongugats erfolgen, das durch die gemischte Anhydridmethode produziert worden war. Ebenso sollte überprüft werden, inwieweit die nachgewiesenen Antikörper T2-Toxin in vitro zu binden vermögen.

Da inzwischen von der Fa. SIGMA ein käufliches T2-Toxin-Kongugat (T2-HS-BSA) auf den Markt kam, wurden 10 Meerschweinchen nach der Methode von NIESCHLAG (1974), wie unter 3.1.2.4 beschrieben, mit diesem immunisiert. Die Impfdosis betrug 100 µg T2-HS-BSA pro Tier. In der 9. Woche wurden die Tiere subkutan (je 100 µg T2-HS-BSA) restimuliert. Die Blutabnahme erfolgte vor und 5 Wochen nach der Grundimmunisierung, sowie 3 Wochen nach der Restimulierung.

Im Gegensatz zu T2-Toxin konnte kein DAS-Kongugat käuflich erworben werden, deshalb wurde mittels der unter 3.1.2.1.1 und 3.1.2.1.2 beschriebenen Methode DAS in ein Hemisuccinat überführt und an BSA gekoppelt. Die Immunisierung und Restimulierung von 10 Meerschweinchen erfolgte wie oben ausgeführt, die Impfdosis betrug auch hier 100 µg DAS-HS-BSA (Proteinbestimmung nach LOWRY). Ebenso wurde in gleichem zeitlichen Abstand Blut zur Titerbestimmung abgenommen.

Versuch 3:

Im dritten Versuchsabschnitt sollte am Beispiel von T2-Toxin die Wirksamkeit unterschiedlicher aktiver Immunisierungsarten untersucht werden: intrakutane Applikation des Antigens mit bzw. ohne anschließende Restimulierung sowie subkutane Grundimmunisierung ohne Restimulierung. Auch sollte während des Versuchs wiederholt das Blutbild erstellt werden, um etwaige Veränderungen durch die Immunisierung bzw. nach der Belastung festzustellen.

Für diesen Versuchsabschnitt wurden 18 Meerschweinchen in sechs Gruppen zu je 3 Tieren aufgeteilt. In den Gruppen 1 und 2 (Tier Nr. C1 mit C6) wurden die Tiere mit je 100 µg T2-HS-BSA (Fa.SIG-MA) intrakutan nach der bereits erwähnten Methode von NIESCHLAG (1974) immunisiert und in der 8. Woche mit je 100 µg T2-HS-BSA subkutan restimuliert. Die Gruppen 3 und 4 (Tier Nr. C7 mit C12) wurden ebenfalls mit 100 µg des Antigens intrakutan grundimmunisiert, jedoch ohne Restimulierung. Die Gruppen 5 und 6 (Tier Nr. C13 mit C18) wurden mit der gleichen Impfdosis subkutan grundimmunisiert ohne anschließende Restimulierung (Tabelle 3).

Tabelle 3: Belastung unterschiedlich immunisierter Meerschweinchen

TIER	GRUNDIMMUNISIERUNG	RESTIMULIERUNG	BELASTUNG
C1 mit C3	i.c.	s.c.	oral
C4 mit C6	i.c.	s.c.	s.c.
C7 mit C9	i.c.	nein	oral
C10 mit C12	i.c.	nein	s.c.
C13 mit C15	s.c.	nein	oral
C16 mit C18	s.c.	nein	s.c.
C19 mit C21	nein	nein	oral
C22 mit C24	nein	nein	s.c.

i.c. = intrakutan s.c. = subkutan

Um eine eventuelle Veränderung des Blutbildes, speziell der Leukozyten- und Lymphozytenzahl, während der Versuchsdauer festzustellen, wurde den Tieren regelmäßig in Narkose aus der cranialen Hohlvene Blut entnommen. Dies geschah zu folgenden Zeitpunkten: vor der Immunisierung, am 4. und 10. Tag sowie 6 Wochen nach der Grundimmunisierung, 4 Tage und 2 Wochen nach der Restimulation und bei den am 6. Tag nach der Belastung noch lebenden Tieren kurz vor der Tötung. Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, bei welchem Tier jeweils Blut genommen wurde. Das Blutbild wurde in der Medizinischen Tierklinik der Universität München über einen Partikelzähler erstellt.

Ein Teil der Blutproben kam zur Gerinnung 2 h ins Wasserbad (37°C), anschließend über Nacht in den Kühlschrank und wurde am nächsten Tag zweimal 20 min lang bei 3.000 U/min zentrifugiert. Die so gewonnenen Seren wurden nach HEBERT et al. (1973) durch Ammoniumsulfatfällung gereinigt und solange gegen PBS dialysiert bis das Außendialysat sulfatfrei war (siehe 3.1.2.3.1).

Tabelle 4: Blutentnahme bei den Meerschweinchen

ZEITPUNKT DER BLUTENTNAHME	TIER
vor der Immunisierung	C1, C4, C7, C10, C13, C16, C19, C22, C25, C27
4 Tage nach der Grundimmunisierung	C1, C5, C8, C10, C14, C17, C18
10 Tage nach der Grundimmunisierung	C2, C4, C5, C7, C10, C13, C16, C18
6 Wochen nach der Grundimmunisierung	C1, C3, C4, C5, C7, C10, C13, C14, C16, C18
4 Tage nach der Restimulierung	C1, C2, C5, C6
2 Wochen nach der Restimulierung	C1, C3, C4, C5
6 Tage nach der Belastung	C1, C2, C3, C5, C7, C8, C9, C10, C11, C13, C15, C16, C18, C27, C29

(Während des Versuchsverlaufs wurde zur Kontrolle zusätzlich von nicht immunisierten Tieren (C20, C24, C25, C26, C28) Blut entnommen)

3.1.2.2.3 Immunisierung von Mäusen

Dieser 4. Versuchsabschnitt sollte zur Klärung der Frage dienen, inwieweit die bei den Meerschweinchen erzielten Ergebnisse auf eine andere Versuchstierart übertragen werden können.

Zur Ermittlung der Immunisierungsdosis wurden in einem Vorversuch je 5 Mäuse mit 5, 10, 20 bzw. 50 µg T2-HS-BSA (Fa. SIGMA) subkutan behandelt (gelöst in NaCl 0,9%ig und Zusatz von kompletten Freund'schen Adjuvans, siehe 3.1.2.2.2). Da jedoch keine spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten, wurde die Impfdosis auf 100 µg T2-HS-BSA pro Tier erhöht und intraperitoneal appliziert.

Zwei Wochen nach dieser zweiten Immunisierung wurde mittels einer Glaskapillare aus dem orbitalen Venenplexus am narkotisierten Tier Blut abgenommen, 2 h bei 37°C ins Wasserbad gestellt und, nachdem es über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt wurde, 2mal 20 min lang bei 3.000 U/min zentrifugiert.

3.1.2.3 Antikörpernachweis

3.1.2.3.1 Aufbereitung der anti-Toxin-Antiseren

Die unter 3.1.2.2.2 gewonnenen Seren wurden nach der Methode von HEBERT (1973) gereinigt. Die Fällung erfolgte mit einer 70%igen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung, die dem Serum im Verhältnis 1:1 unter ständigem Rühren tropfenweise zugegeben wurde. Danach blieben die Proben 4 h bei Raumtemperatur stehen, bevor sie 20 min zentrifugiert wurden (3.000 U/min). Das Präzipitat wurde in etwas Phosphatpuffer (PBS) gelöst und die Fällung noch zweimal wiederholt; jedoch wurde nun sofort nach dem Zugabe der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung zentrifugiert. Danach wurde das Zentrifugat entsprechend der Ausgangsmenge des Serums in PBS gelöst und solange gegen PBS dialysiert, bis das Außendialysat sulfatfrei war. Die Kontrolle erfolgte mit BaCl_2 unter leichter Ansäuerung. Die so gewonnenen Antiseren wurden portioniert und bei -20°C eingefroren.

3.1.2.3.2 Enzymmarkierung der Toxine mittels Carbodiimid-Methode

Als Marker wurde Meerrettichperoxidase (HRP) eingesetzt, die die Forderungen: hoher Substratumsatz, einfacher Nachweis, leichte Verfügbarkeit (SCHUURS und VAN WEEMEN, 1977) erfüllt. Ein am Institut hergestelltes T2-HS wurde nach der Methode von PESTKA et al. (1981) an Meerrettichperoxidase (HRP) (Fa. SIGMA) gekoppelt. Die dabei angewandte Carbodiimidmethode wurde von PESTKA (1980) für die Herstellung des Aflatoxin B₁-Oxim-Peroxidase-Konjugat beschrieben. Für diese Kopplung wurden 1,3 mg T2-HS in 1 ml Ethanol gelöst, mit 3 ml H₂O gemischt und 200 mg Ethyldimethylaminopropylcarbodiimid (EDPC) zugefügt. Unter ständigem Rühren wurden 5 mg HRP (gelöst in 1 ml 25%igem wässrigem Ethanol) zugetropft. Nach 30 min wurden weitere 200 mg EDPC (gelöst in 1 ml 25%igem Ethanol) zugegeben und über Nacht im Kühlschrank gerührt. Das Kopplungsprodukt wurde anschließend über eine Sephadex G50-Säule geschickt und der Peroxidasegehalt der einzelnen Fraktionen nach LOWRY bestimmt. Um die Enzymaktivität des Kopplungsproduktes zu ermitteln und den Unterschied der Aktivität gegenüber der von Meerrettichperoxidase zu bestimmen, wurden von T2-HS-HRP und HRP Verdünnungsreihen auf Mikrotiterplatten angelegt, die nach der Umsetzung mit o-Phenylendiamin-Substratpuffer (oPD-Substratpuffer) verglichen wurden.

Die Herstellung von DAS-HS-HRP erfolgte entsprechend der von T2-HS-HRP. Auch hier wurden verschiedene Verdünnungsreihen von DAS-HS-HRP und HRP auf Mikrotiterplatten angelegt um die Enzymaktivität des Kopplungsprodukts zu ermitteln.

3.1.2.3.3 Enzymmarkierung der Toxine mittels gemischter Anhydrid-Methode

Mittels der gemischten Anhydridreaktion nach DEAN et al. (1972), die auch von BIERMANN und TERPLAN (1980) für die Kopplung von Aflatoxin B₁ an Meerrettichperoxidase (HRP) beschrieben wird,

wurde T2-Toxin bzw. DAS ebenfalls an HRP gekoppelt.
Dies geschah im Rahmen einer anderen Untersuchung am Institut.

3.1.2.3.4 Ermittlung der optimalen Verdünnung des Toxin- Peroxidase-Konjugats

Antiserum wurde in der Mikrotiterplatte mit Carbonat-Bicarbonat-Puffer 1:2 weiterverdünnt (Ausgangsverdünnung 1:50; pro Kavität 100 µl) und nach 3 h Inkubation bei 37°C wurden die Platten 3mal mit NaCl/TWEEN 20 gewaschen und ausgeschlagen. Nach dem Absättigen der Platte (2%iges FCS/PBS, 30 min auf dem Taumler) und erneutem Waschen und Ausschlagen, wurde das Toxin-Peroxidase-Konjugat in den Verdünnungen 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800 (in PBS/0,05% TWEEN 20 (PESTKA, 1981)) auf die Platte gebracht (100 µl pro Kavität). Nach 1 h taumeln wurden die Platten gewaschen und ausgeschlagen. Durch die Zugabe von oPD-Substrat (100 µl pro Kavität; siehe auch 3.1.2.3.5) konnte das an die Festkörperphase gebundene Enzymkonjugat bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Autoreaders. Da die Bindung des Toxin-Peroxidase-Konjugates an das Immunsorbens auch von der Wahl des Lösungsmittels abhängig ist, wurde folgender Versuch durchgeführt: Die enzymmarkierten Toxine wurden in einer Verdünnung von 1:400 auf die mit Antiserum beschichteten Platten verbracht, wobei als Verdünnungsmittel PBS/0,1% TWEEN 20, PBS/1% FCS bzw. PBS/5% BSA dienten. Um die Frage zu klären, inwieweit das Konjugat mit FCS und BSA allein reagiert, wurden im Rahmen anderer Untersuchungen am Institut Mikrotiterplatten lediglich mit PBS/1% FCS bzw. PBS/1% BSA beschichtet und nach der Konjugat- und Substratzugabe ausgewertet.

3.1.2.3.5 Antikörpernachweis mittels indirektem ELISA

Damit während des Immunisierungsversuchs die Bildung spezifischer Antikörper gegenüber T2-Toxin bzw. DAS nachgewiesen werden konnten, wurden in Anlehnung an die Methode von ENGVALL und

PERLMANN (1971) mit den unter 3.1.2.2.2 gewonnenen und unter 3.1.2.3.1 gereinigten Antiseren ein indirekter ELISA durchgeführt. Die in Hemisuccinate überführten Toxine wurden hierzu, wie unter 3.1.2.1.2 beschrieben, nach der Methode von CHU et al. (1979) an Hühnerserumalbumin (CSA) gekoppelt. Die Mikrotiterplatten (Fa. DYNATECH) wurden mit je 100 μ l Toxin-HS-CSA-Konjugat pro Kavität beschichtet, wobei die Konjugatkonzentration 1 μ g/ml in Carbonat-Bicarbonat-Puffer (pH 9,6) betrug. Nach CATT et al. (1970) wird durch diesen Puffer eine maximale Bindung erreicht. Nach 3stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Platten 3mal mit NaCl/TWEEN 20 gewaschen und ausgeschlagen. Anschließend wurden die Platten mit 5%igem BSA in PBS (200 μ l pro Kavität) 1/2 h abgesättigt. Danach wurden die Platten wiederum 3mal mit NaCl/TWEEN 20 gewaschen und ausgeschlagen. Das durch die Ammoniumsulfatfällung (siehe 3.1.2.3.1) gewonnene Meerschweinchen-Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:100 (verdünnt in PBS/0,05% TWEEN 20) auf die Platte gegeben (100 μ l pro Kavität) und in der Platte 1:2 weiterverdünnt.

Die Platten wurden nun 1 h auf dem Taumler bei Raumtemperatur bewegt und anschließend wiederum gewaschen und ausgeschlagen. Das anti-Meerschweinchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (Fa. SIGMA) wurde für anti-T2-Toxin-Antiserum in einer Verdünnung von 1:10.000 in PBS, für anti-DAS-Antiserum in einer Verdünnung von 1:20.000, in die Kavitäten pipettiert (je 100 μ l), danach wurden die Platten wieder 1 h auf dem Taumler bewegt, bevor sie gewaschen und ausgeschlagen wurden. Anschließend wurden pro Kavität 100 μ l oPD in Substratpuffer zugesetzt (pro 100 ml Substratpuffer 271 mg oPD und 51 μ l 30%iges H₂O₂), nach 20 min die Reaktion mit H₂SO₄ (1,25 mol/l) gestoppt (pro Kavität 25 μ l) und die Platten direkt mit Hilfe eines ELISA-Autoreaders ausgewertet.

Durch einen indirekten ELISA wurde auch der Antikörpertiter in Versuch 4 bestimmt: Mikrotiterplatten wurden mit T2-HS-BSA (Fa.

SIGMA) in einer Verdünnung von 1:500 in PBS beschichtet (100 μ l pro Kavität), über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend 30 min mit PBS/BSA 5% abgesättigt. Nach dem Waschen und Ausschlagen der Platten wurde anti-T2-Toxin-Antiserum zupipettiert, Ausgangskonzentration 1:10 in PBS und in der Platte 1:3 weiterverdünn. Die weiteren Schritte, einschließlich der der Auswertung, erfolgten wie oben beschrieben, wobei anti-Maus-IgG-HRP in einer Verdünnung von 1:1.000 in PBS zugegeben wurde (100 μ l pro Kavität).

3.1.2.3.6 Antikörpernachweis mittels direktem ELISA

Die gegen T2-Toxin bzw. DAS gerichteten Antiseren, die wie unter 3.1.2.3.1 beschrieben gereinigt worden waren, wurden mit Carbonat-Bicarbonat-Puffer in der Mikrotiterplatte, von einer 1:50 Verdünnung ausgehend, 1:2 weiterverdünnt. Nach 3 h Inkubation bei 37°C, Waschen und Ausschlagen, wurden die Platten mit 5%igem BSA/PBS abgesättigt (200 μ l pro Kavität) und für 30 min auf dem Taumler bewegt. Nach erneutem Waschen und Ausschlagen wurde T2-HS-HRP bzw. DAS-HS-HRP in der Verdünnung 1:400 (100 μ l pro Kavität) in die entsprechenden Kavitäten der Platten gegeben, die dann für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Taumler bewegt wurden. Beide Toxin-Peroxidase-Konjugate waren durch die unter 3.1.2.3.3 beschriebene gemischte Anhydridmethode hergestellt worden; die Verdünnung erfolgte in PBS/BSA 5%. Anschließend wurden die Platten gewaschen und ausgeschlagen, bevor oPD-Substrat (siehe 3.1.2.3.5) zupipettiert wurde. Die Reaktion wurde nach 20 min durch Zugabe von 25 μ l H_2SO_4 (1,25 mol/l) pro Kavität gestoppt und im ELISA-Autoreader ausgewertet.

Da bei dem unter 3.1.2.3.5 beschriebenen Versuch (indirekter ELISA) der Verdacht bestand, daß im anti-T2-Mäuse-Antiserum enthaltene Antikörper u.a. mit dem zur Absättigung eingesetzten BSA reagiert haben (zur Immunisierung der Mäuse wurde T2-HS-BSA verwendet), wurde im folgenden Experiment (direkter ELISA) die Doppelantikörpertechnik sowie ein heterologer ELISA angewandt: Mikrotiterplatten wurden mit anti-Maus-Schaf-IgG (Fa. SIGMA;

10 µg/ml; 100 µl pro Kavität) beschichtet; Inkubation und Absättigung erfolgten wie oben erwähnt. Danach wurde anti-T2-Maus-Antiserum, ebenfalls in einer Ausgangskonzentration von 1:10 in PBS zupipettiert und in der Platte 1:3 weiterverdünnt. Nach erneuter einstündiger Inkubation wurden die Platten gewaschen und ausgeschlagen. Danach wurden pro Kavität 100 µl HT2-Toxin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (HT2-HRP, die Kopplung an HRP erfolgte über einen aktivierten Ester als reaktives Zwischenprodukt (ESGIN); Verdünnung 1:1.000 in PBS) zugegeben. Dieses heterologe Prinzip, das Enzymkonjugat mit einem dem Immunogen nah verwandten Toxin herzustellen, das sich von jenem durch eine funktionelle Gruppe unterscheidet, wurde am Institut für mehrere Mykotoxine erarbeitet (MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1986). Über den hier angewandten heterologen ELISA (T2-Toxin, Teil des Immunogens und HT2-Toxin, Teil des Enzymkonjugats) wird an anderer Stelle berichtet (ESGIN). Nach der Inkubation für 1 h auf dem Taumler und nach erneutem Waschen und Ausschlagen erfolgte der Zusatz von oPD wie oben erwähnt. Auch hier wurde direkt mit Hilfe des ELISA-Autoreaders ausgewertet.

3.1.2.3.7 Nachweis der toxinbindenden Wirkung der Antikörper

Zur Feststellung, inwieweit freies T2-Toxin bzw. DAS in der Lage ist, das entsprechende enzymmarkierte Toxin an der Bindung mit dem Antikörper zu hindern, wurden mit Antiserum beschichtete Platten (Antiserumverdünnung 1:400) mit verschiedenen T2-Toxin- bzw. DAS-Konzentrationen beschickt. Hierzu wurden die Toxine in 10%igen MeOH/PBS gelöst und in Konzentrationen von 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg und 1 pg auf die Platte gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 1 h (auf dem Taumler), wurden die Toxinlösungen abgesaugt und das entsprechende Toxin-Peroxidasekonjugat in einer Verdünnung von 1:400 in PBS/BSA 5% zupipettiert (100 µl pro Kavität). Nachdem die Platten 1 h auf dem Taumler bewegt worden waren, wurden sie gewaschen und ausgeschlagen. Die gebundene Enzymaktivität wurde mit oPD-Substrat in der üblichen Weise bestimmt (siehe 3.1.2.3.5 und 3.1.2.3.6).

3.1.2.4 Belastungsversuche

3.1.2.4.1 Applikation der Toxine

Versuch 1:

Um die Wirksamkeit der Immunisierung zu untersuchen, wurden die Meerschweinchen einem Belastungstest unterzogen. Nach DE NICOLA et al. (1978) liegt die LD_{50} von T2-Toxin nach oraler Aufnahme bei 3,06 mg/kg/KGW, nach KRIEGLEDER (1980) bei 2,52 mg/kg/KGW, die für DAS bei 2,14 mg/kg/KGW (KRIEGLEDER, 1980). Für den oralen Belastungsversuch wurde die Dosis von 4,5 mg T2-Toxin bzw. DAS pro kg Körpergewicht gewählt. Das jeweilige Toxin wurde zunächst in Dimethylformamid (DMF) gelöst und mit Aqua dest. zur Stammlösung verdünnt. Der Anteil des Lösungsvermittlers DMF betrug 1:20 der Stammlösung (KRIEGLEDER, 1980). Mittels einer starren, 12 cm langen Knopfkanüle erfolgte die Toxinapplikation in den Magen, die Tiere wurden dabei von einer Hilfsperson am Nacken gehalten und der Kopf gestreckt. 2 Kontrolltieren wurde nur DMF/Aqua dest. per Magensonde verabreicht und je 2 nicht immunisierten Meerschweinchen wurde T2-Toxin bzw. DAS in der oben beschriebenen Art appliziert.

Versuch 2:

Die orale Applikation (3,5 mg T2-Toxin bzw. DAS pro kg KGW) erfolgte wiederum direkt in den Magen der Tiere mittels einer starren Knopfkanüle. Auf diese Art wurden 4 gegen T2-Toxin immunisierte Meerschweinchen (Tier-Nr. B1, B2, B3, B4) sowie 2 nicht immunisierte Tiere (B11, B12) belastet.

Mit DAS wurden ebenfalls 4 gegen DAS immunisierte Tiere (B13, B14, B15, B16) und 2 nicht immunisierte Kontrolltiere (B23, B24) belastet.

Für die subkutane Belastung wurde T2-Toxin bzw. DAS in Ethanol aufgenommen und mit Olivenöl (SATO, 1975) verdünnt. Der Anteil des Ethanols betrug 1/20 dieser Lösung. Es wurden jeweils 4 immunisierte Tiere (für T2-Toxin Nr. B5, B6, B7, B8; für DAS Nr. B17, B18, B19, B20) belastet.

Die Belastungsdosis betrug 3,5 mg Toxin pro kg KGW. Weiterhin wurden je 2 nicht immunisierte Kontrolltiere (für T2-Toxin Nr. B9, B10; für DAS Nr. B21, B22) mit dieser Toxinmenge subkutan belastet. Ferner wurde den nicht immunisierten Tieren B25 und B26 nur das Lösungsmittel DMF/Aqua dest. oral mittels Magensonde verabreicht, den Tieren B27 und B28 das Ethanol-Olivenöl-Gemisch subkutan appliziert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Belastungstest Meerschweinchen

TIER	GRUNDIMMUNISIERUNG und RESTIMULIERUNG	BELASTUNG (Toxin)
B1 mit B4 B5 mit B8 B9, B10 B11, B12	gegen T2-Toxin gegen T2-Toxin nein nein	oral (T2-Toxin) s.c. (T2-Toxin) s.c. (T2-Toxin) oral (T2-Toxin)
B13 mit B16 B17 mit B20 B21, B22 B23, B24	gegen DAS gegen DAS nein nein	oral (DAS) s.c. (DAS) s.c. (DAS) oral (DAS)
B25, B26 B27, B28	nein nein	nein nein

s.c. = subkutan

Versuch 3:

Den immunisierten Meerschweinchen C1, C2, C3, C7, C8, C9, C13, C14, C15 sowie 3 nicht immunisierten Kontrolltieren (C19, C20, C21) wurde das T2-Toxin in einer Dosis von 4,4 mg pro kg KGW oral verabreicht. Die Tiere C4, C5, C6, C10, C11, C12, C16, C17, C18 sowie die nicht immunisierten Kontrollen C22, C23 und C24 wurden subkutan mit je 4,4 mg T2-Toxin pro kg KGW belastet. Auf die Verabreichung der Lösungsmittel allein (DMF/Aqua dest. oral bzw. Ethanol/Olivenöl subkutan) wurde verzichtet, da dies schon in den vorhergehenden Versuchsabschnitten überprüft worden war und weder klinische noch bei der Obduktion pathologisch-anatomische Besonderheiten festzustellen waren (siehe 3.1.3).

Versuch 4:

Analog zur Belastungsdosis, die bei den Meerschweinchen eingesetzt worden war, wurde bei den Mäusen als Dosis das ca. 1 1/2fache der LD₅₀ gewählt. Die LD₅₀ oral wird für Mäuse mit 10,2 mg pro kg KGW angegeben, für die intraperitoneale Applikation eine LD₅₀ von 5,2 mg pro kg KGW (UENO et al., 1972). Die orale Belastungsdosis betrug somit 16 mg/kg KGW bzw. 8 mg/kg KGW für die intraperitoneale Belastung.

Für den Versuch wurde das T2-Toxin in Methanol gelöst und durch Zugabe von Aqua dest. auf die Stammlösung verdünnt, wobei für die orale Belastung in 100 µl der Stammlösung 0,4 mg T2-Toxin, für die intraperitoneale Belastung 0,2 mg T2-Toxin je 100 µl Stammlösung vorhanden waren.

Im Versuch wurden je 6 immunisierte Tiere oral (M1 mit M6) bzw. intraperitoneal (M10 mit M15) belastet sowie je 3 nicht immunisierte Kontrolltiere oral (M7, M8, M9) und intraperitoneal (M16 M17, M18) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Belastungstest Maus

TIER	IMMUNISIERUNG	BELASTUNG
M1 mit M6	i.p.	oral
M7 mit M9	nein	oral
M10 mit M15	i.p.	i.p.
M16 mit M18	nein	i.p.

i.p. = intraperitoneal

3.1.2.4.2 Beobachtung der Tiere

Bis zur 10. Stunde nach der Toxinapplikation wurden die Tiere stündlich kontrolliert. Ab der 15. Stunde laufende Beobachtung bis zur 20. Stunde, dann 4malige Kontrolle täglich. Am 6. Tag nach der Toxinapplikation wurden die noch lebenden Tiere durch eine intracardiale Applikation von T61[®] getötet (in Versuch 4 am 7. Tag).

In Versuch 2 und 3 wurden die Tiere bis zur 8. Stunde nach der oralen bzw. subkutanen Belastung stündlich kontrolliert. Weitere stündliche Kontrolle in Versuch 2 ab der 21. bis zur 31., in Versuch 3 ab der 23. bis 30. Stunde.

In Versuch 4 stündliche Kontrolle bis zur 5. Stunde sowie zwischen der 20. und 29. Stunde.

Bei allen verendeten bzw. am Versuchsende getöteten Tieren wurde eine Sektion und eine makroskopische Untersuchung durchgeführt.

3.1.3 Ergebnisse

Antigenherstellung

Anhand der Dünnschichtchromatogramme läßt sich eine vollständige Umsetzung des T2-Toxin bzw. DAS zu T2-HS bzw. DAS-HS feststellen. Die so ermittelten Rf-Werte für T2-Toxin und DAS bzw. deren Hemisuccinate sind in Tabelle 7 aufgeführt (ESGIN, 1983).

Tabelle 7: Vergleich der ermittelten Rf-Werte für T2-Toxin bzw. DAS und deren Hemisuccinate

Verbindung	Rf-Wert
T2-Toxin	0,53
T2-HS	0,70
DAS	0,50
DAS-HS	0,64

Immunisierung

Die im Vorversuch zur Ermittlung der Impfdosis eingesetzten verschiedenen T2-HS-HSA-Konzentrationen verursachten lediglich leichte Schwellungen und Rötungen an den intrakutanen Applikationsstellen, jedoch konnte keine Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes festgestellt werden, so daß für den 1. Versuch die Impfdosis von 10 µg T2-HS-HSA bzw. DAS-HS-HSA gewählt wurde, später von 100 µg Toxin-HS-BSA pro Tier.

Der Versuch, durch intranasale Immunisierung spezifische Antikörper zu produzieren wurde abgebrochen, da trotz 4maliger Wiederholung der Grundimmunisierung kein Antikörpertiter im ELISA festgestellt werden konnte. Als Titer wurde der Wert festgelegt, bei dem sich die Extinktion noch deutlich von der des Präimmunsersums unterscheidet.

Im Versuch mit Mäusen konnten durch das Erhöhen der Impfdosis von 10 µg auf 100 µg T2-HS-BSA pro Tier und einer intraperitonealen Verabreichung des Antigens schon 2 Wochen nach der Immunisierung spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Antikörperbildung und Immunität

Versuch 1:

Im indirekten ELISA wurden für das anti-T2-Toxin-Antiserum Titerwerte von 12.800 bis 25.600 festgestellt, die durch die Restimulierung kaum merklich gesteigert werden konnten. Ähnliche Werte wurden für das anti-DAS-Antiserum ermittelt.

Um einen direkten ELISA durchzuführen, wurden T2-Toxin bzw. DAS mit Meerrettichperoxidase markiert, wobei anhand der Umsetzung von oPD-Substrat für T2-HS-HRP eine maximale Enzymaktivität bei einer Verdünnung von 1:200 bis 1:400 in PBS, für DAS-HS-HRP von 1:200 bis 1:800 in PBS ermittelt wurden (die Platten waren mit dem jeweiligen anti-Toxin-Antiserum beschichtet). Für den kompetitiven ELISA wurden die Verdünnungen 1:200 für T2-HS-HRP und 1:400 für DAS-HS-HRP (jeweils in PBS) eingesetzt (Abb. 2 und 3).

Für die optimale Toxin-Peroxidase-Konjugat-Verdünnung wurde ein Wert von 1:400 für beide Toxine ermittelt. Durch das Einsetzen von PBS/5% BSA ist eine sehr gute Bindung an das Immunosorbens gewährleistet.

Durch Titration der gewonnenen und gefällten Seren mittels enzymmarkierten Toxins konnte beim Bestimmen des Antikörpertiters eine Stunde gegenüber der Durchführung des indirekten ELISA eingespart werden. Da ferner ein Reaktionsschritt entfällt, wird auch die Zahl möglicher Fehlerquellen reduziert. Die durch den direkten ELISA ermittelten Antikörpertiter sind in Abb. 4 und 5 dargestellt.

In Abb. 6 ist dargestellt, inwieweit freies T2-Toxin in der Lage war, die Konjugatbindung an das Immunosorbens zu hemmen. Für DAS konnte nur eine sehr schwache Hemmung festgestellt werden (Abb. 7).

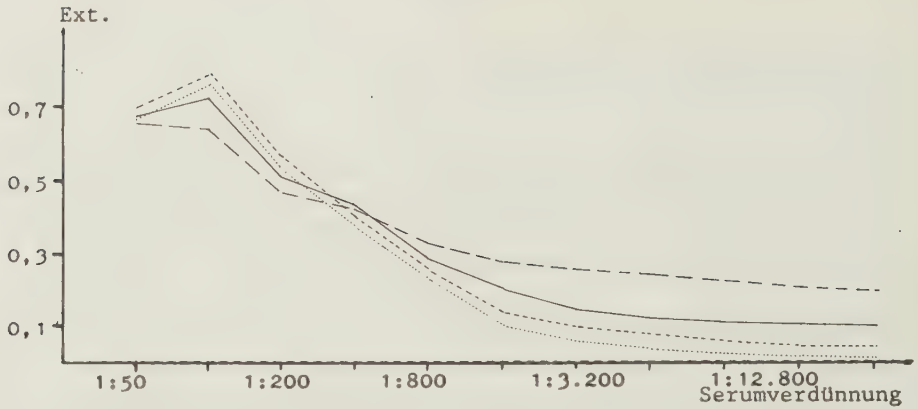


Abb. 2: Titrationskurven der verschiedenen Verdünnungen von T2-HS-HRP (---)1:50, (—)1:100, (·····)1:200, (-·-·-)1:400

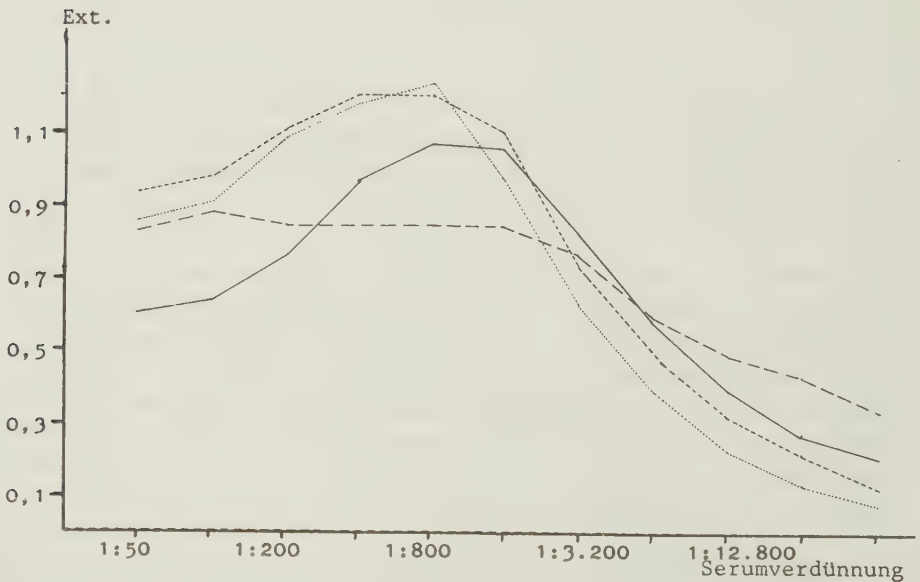


Abb. 3: Titrationskurven der verschiedenen Verdünnungen von DAS-HS-HRP (---)1:50, (—)1:100, (·····)1:200, (-·-·-)1:400

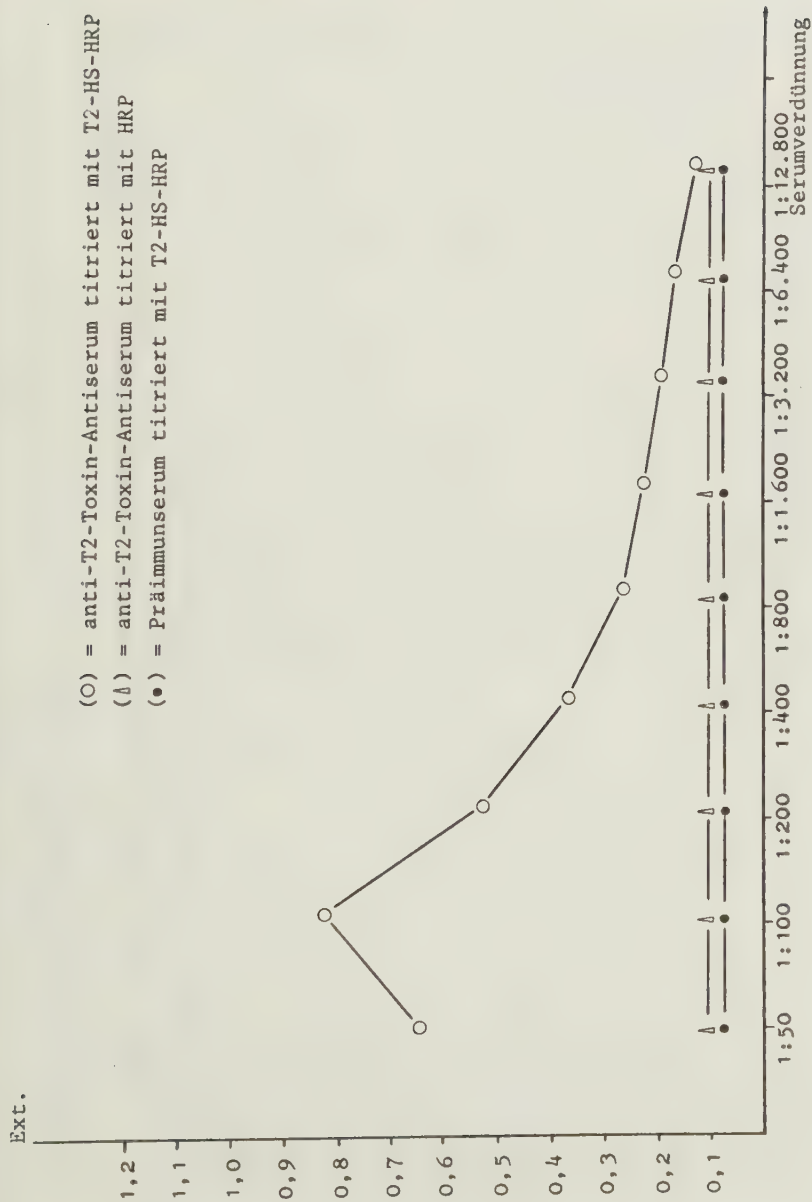


Abb. 4: anti-T2-Toxin-Antikörperbestimmung durch direkten ELISA

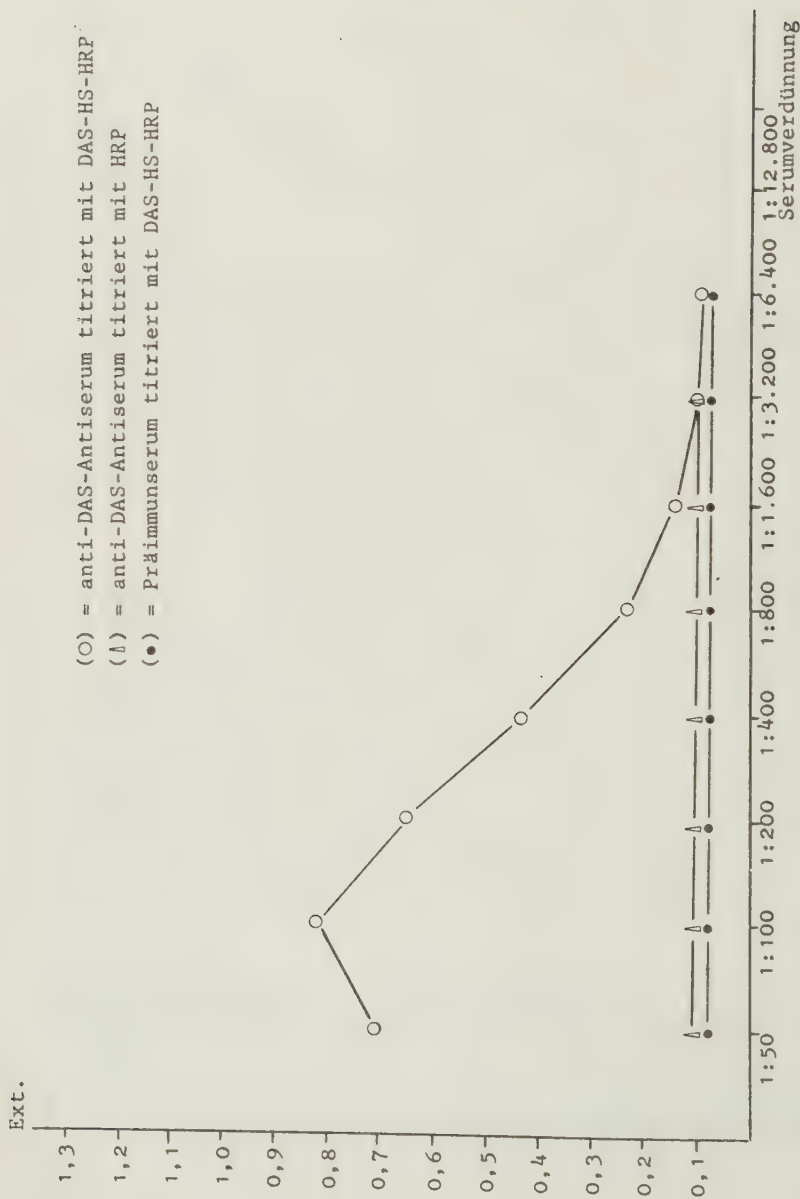


Abb. 5: anti-DAS-Antikörperbestimmung durch direkten ELISA

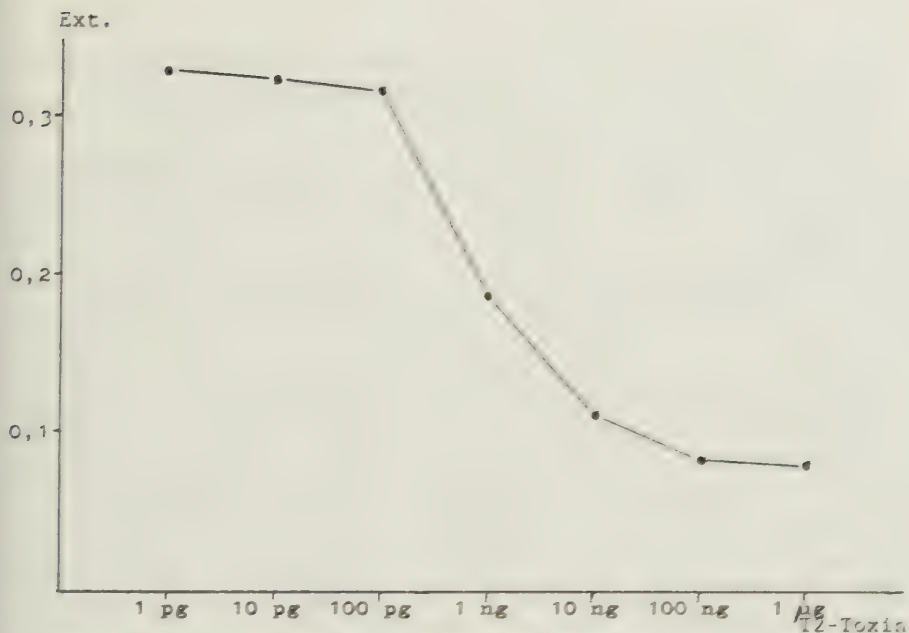


Abb. 6: Hemmung der Bindung des T2-HS-HRP-Konjugats an das Immunosorbens durch freies T2-Toxin

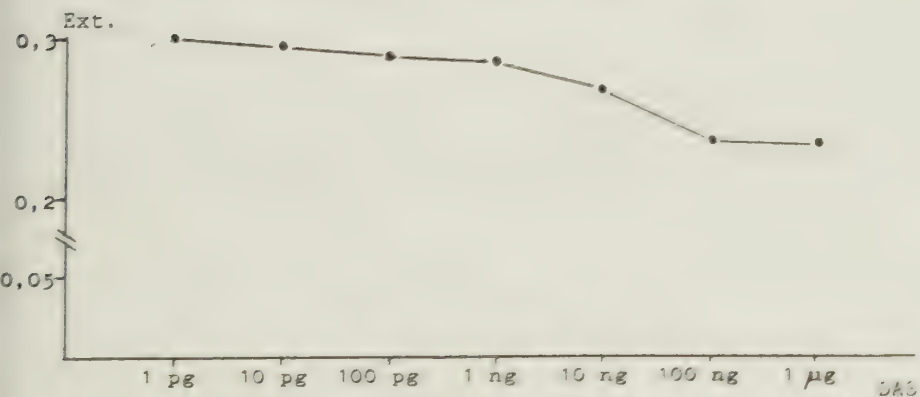


Abb. 7: Hemmung der Bindung des DAS-HS-HRP-Konjugats an das Immunosorbens durch freies DAS

In den ersten 4 h nach der Toxinapplikation konnten bei keinem Tier auffällige klinische Symptome beobachtet werden. Auch waren Futter- und Wasseraufnahme normal. Ab der 5. Stunde fiel bei den nicht immunisierten Kontrolltieren eine zunehmende Apathie auf, weder Wasser noch Futter wurde aufgenommen und schließlich verendeten die Tiere ca. 9 h nach der Belastung. Ab der 6. Stunde nach der Toxinverabreichung konnte auch bei den immunisierten Tieren eine zunehmende Störung des Allgemeinbefindens beobachtet werden, was zunächst durch ein gesträubtes Fell, später durch Bewegungslosigkeit bis hin zur völligen Apathie gekennzeichnet war, ebenso konnte weder Wasser- noch Futteraufnahme beobachtet werden. Mit Ausnahme der Tiere A4 und A8 aus der T2-Gruppe und dem Tier A21 aus der DAS-Gruppe, die in der 19. bzw. 21. Stunde nach der Belastung starben, verendeten die übrigen immunisierten Tiere zwischen der 10. und 15. Stunde. Die zwei Kontrolltiere A29 und A30, denen nur das Lösungsmittel DMF/Aqua dest. verabreicht worden war, zeigten zu keinem Zeitpunkt des Versuchs irgendwelche Störungen (Tabellen 8 und 9).

Bei der Obduktion der verendeten Tiere ergab sich folgender identischer makroskopischer Befund: Hyperämie der großen Parenchyme bei unterschiedlich starker Betroffenheit der Milz; dilatierter Magen mit wässrigem Inhalt; kleinflächige Blutungen in der Schleimhaut des Magens und des Dünndarms; Lungenemphysem. Anzeichen für Stoffwechsel- oder Infektionskrankheiten lagen nicht vor. Die am Versuchsende getöteten Kontrolltiere zeigten makroskopisch keine pathologischen Veränderungen.

Tabelle 8: Aktive Immunisierung gegen T2-Toxin und Belastungsversuch (Meerschweinchen)

TIER	GRUNDIMMUNISIERUNG	RESTIMULIERUNG	BELASTUNG	TOD in h nach Belastung
A1	10 µg T2-HS-HSA, intrakutan	6.,9.,12. Woche, subkutan	4,5 mg T2- Toxin/kg/ KGW, oral, 15. Woche	10 - 15
A2				10 - 15
A3				10 - 15
A4				19
A5				10 - 15
A6				10 - 15
A7				10 - 15
A8				19
A9				10 - 15
A10				10 - 15
A11				10 - 15
A12				10 - 15
A13	Kontrolle	---		8
A14		---		9
A29	Kontrolle	---	DMF/ Aqua dest.	*
A30		---		*

* = am 6. Tag nach der Toxinapplikation getötet

Tabelle 9: Aktive Immunisierung gegen DAS und Belastungsversuch
(Meerschweinchen)

TIER	GRUNDIMMUNISIERUNG	RESTIMULIERUNG	BELASTUNG	TOD in h nach Belastung
A15	10 ug DAS-HS-HSA, intrakutan	6., 9., 12. Woche, subkutan	4,5 mg DAS/ kg/KGW, oral, 15. Woche	10 - 15
A16				10 - 15
A17				10 - 15
A18				10 - 15
A19				10 - 15
A20				10 - 15
A21				21
A22				10 - 15
A23				10 - 15
A24				10 - 15
A25				10 - 15
A26				10 - 15
A27	Kontrolle	---		8
A28		---		8
A29	Kontrolle	---	DMF/ Aqua dest.	*
A30		---		*

* = am 6. Tag nach der Toxinapplikation getötet

Versuch 2:

Die durch direkten ELISA ermittelten Antikörpertiter lagen bei 1:6.400 für T2-Toxin und 1:3.200 für DAS (Abb. 8 und 9); durch die Restimulierung war kein nennenswerter Titeranstieg zu erzielen.

Im Belastungstest waren in den ersten Stunden nach der oralen bzw. subkutanen Verabreichung der Toxine keine klinischen Symptome an den Tieren festzustellen; Futter- und Wasseraufnahme waren normal. Bei den Tieren B5, B9, B10 (T2-Toxin-Gruppe) sowie B17, B18, B21, B22, B24 (DAS-Gruppe) trat der Tod zwischen der 8. und 21. Stunde nach der Toxinverabreichung ein. Bei Tier B20 zeigten sich nach der 21. Stunde sehr starke Bewegungsstörungen mit anschließender totaler Apathie; der Tod trat in der 27. Stunde ein. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die Tiere B11, B12, B13, B14, B15 und B23 reduziertes Allgemeinbefinden sowie gesträubtes Fell, alle anderen Tiere waren völlig normal. Am nächsten Tag wurden B11, B12, B14, B15, B16 und B23 tot aufgefunden (Tod zwischen der 32. und 45. Stunde nach der Belastung). Alle anderen Tiere zeigten keinerlei klinische Symptome bzw. hatten sich wieder erholt (Tabellen 10 und 11).

Bei der Obduktion der verendeten Tiere ergab sich folgender identischer makroskopischer Befund: Hyperämie der großen Parenchyme bei unterschiedlich starker Betroffenheit der Milz; der Magen war mit bis zu gänseeigroßer Futtermenge gefüllt; die Magenschleimhaut wies Hyperämie auf; Lungenemphysem; stumpfkegelförmiges Herz mit leichter Rechtsherzdilatation. Bei den Tieren B15 und B16 petechiale Blutungen in der Magenschleimhaut, bei den Tieren B17, B18, B20, B21, B22 leicht schaumige Beschaffenheit des Caecuminhalts; die Kotformung war mit Ausnahme von Tier B20 komplett erhalten. Anzeichen für Stoffwechsel- oder Infektionskrankheiten lagen nicht vor. Bei den am Versuchsende getöteten Tieren ergaben sich makroskopisch keine pathologischen Veränderungen.

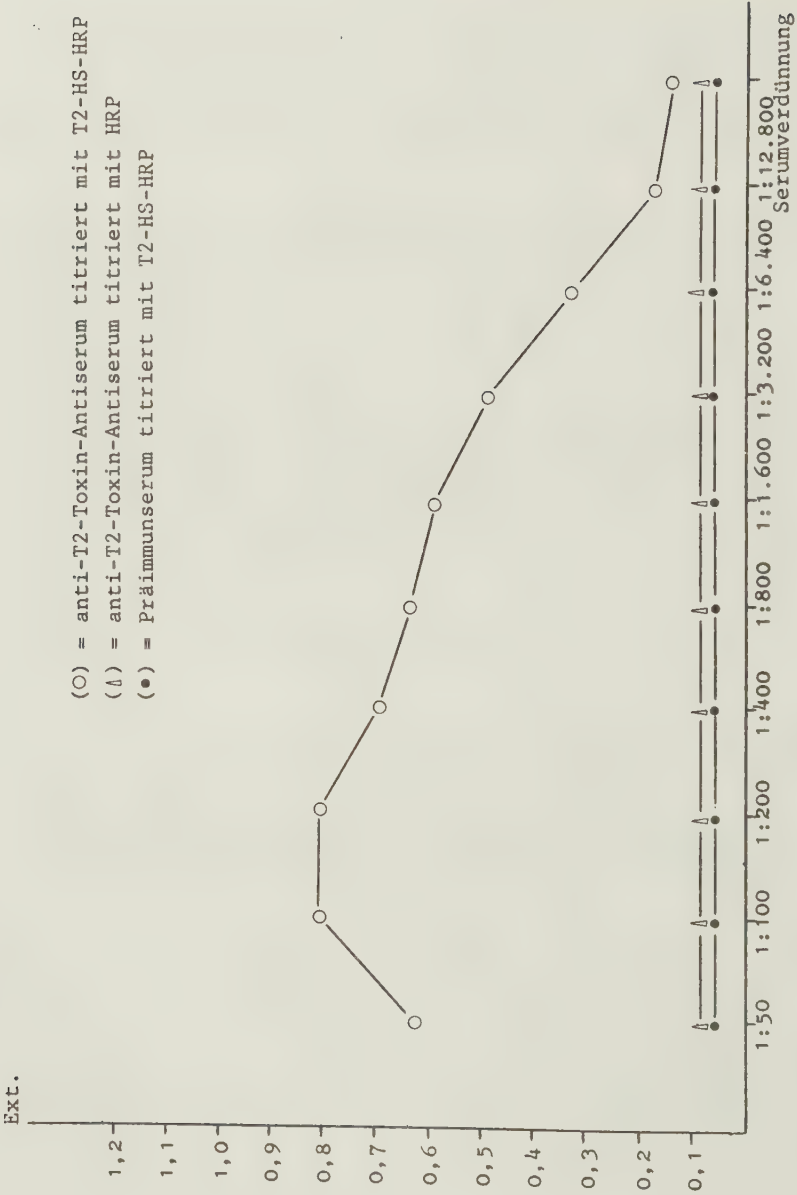


Abb. 8: anti-T2-Toxin-Antikörperbestimmung durch direkten ELISA

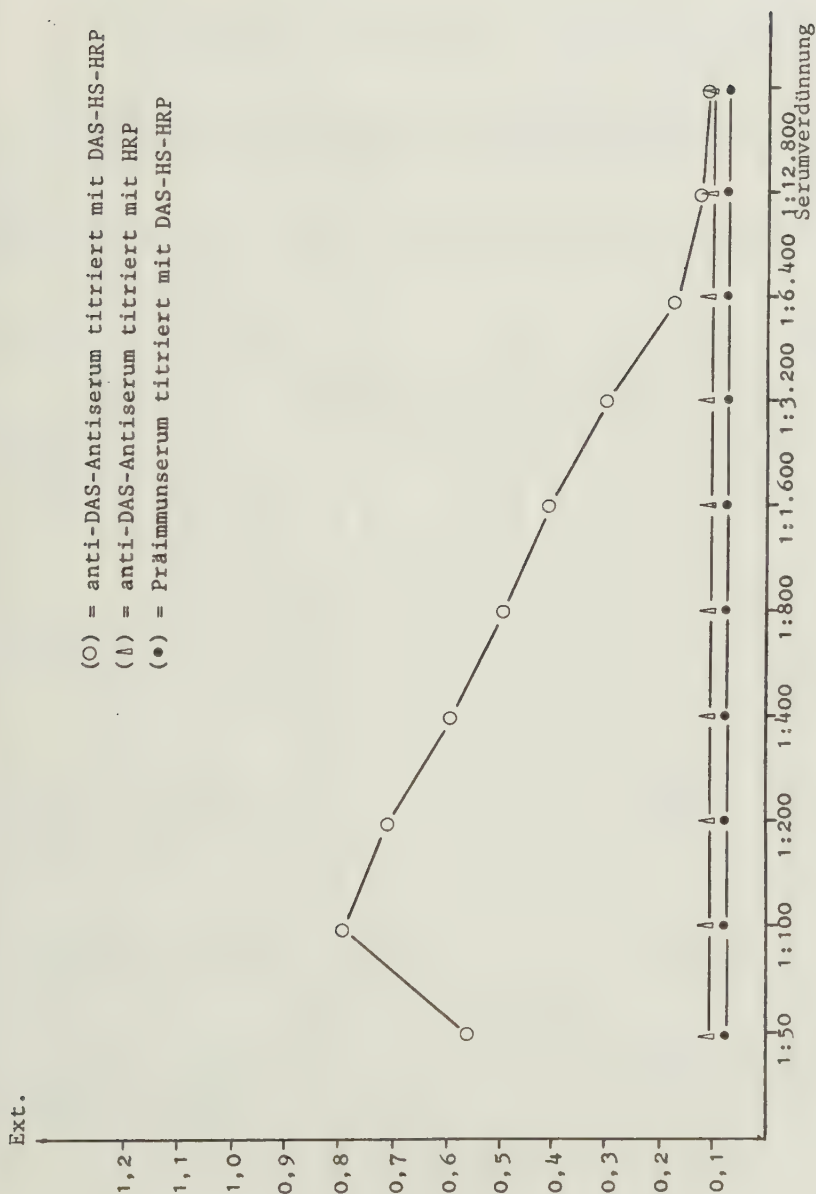


Abb. 9: anti-DAS-Antikörperbestimmung durch direkten ELISA

Tabelle 10: Aktive Immunisierung gegen T2-Toxin und Belastungs-
versuch (Meerschweinchen)

TIER	GRUNDIMMUNISIERUNG	RESTIMULIERUNG	BELASTUNG	TOD in h nach Belastung
B1	100 µg T2-HS-BSA, intrakutan	9. Woche, subkutan	3,5 mg T2- Toxin/kg/ KGW, 15.Wo. oral	*
B2				*
B3				*
B4				*
B5			3,5 mg T2- Toxin/kg/ KGW, 15.Wo. subkutan	8 - 21
B6				*
B7				*
B8				*
B9	Kontrolle	---	3,5 mg T2- Toxin/kg/ KGW, 15.Wo. subkutan	8 - 21
B10		---		8 - 21
B11	Kontrolle	---	3,5 mg T2- Toxin/kg/ KGW, 15.Wo. oral	32 - 45
B12		---		32 - 45
B25	Kontrolle	---	DMF/ Aqua dest.	*
B26		---		*
B27	Kontrolle	---	Ethanol/ Olivenöl	*
B28		---		*

* = am 6. Tag nach der Toxinapplikation getötet

Tabelle 11: Aktive Immunisierung gegen DAS und Belastungsversuch
(Meerschweinchen)

TIER	GRUNDIMMUNISIERUNG	RESTIMULIERUNG	BELASTUNG	TOD in h nach Belastung
B13 B14 B15 B16	100 µg DAS-HS-BSA, intrakutan	9. Woche, subkutan	3,5 mg DAS/ kg/KGW, 15. Woche, oral	*
				32 - 45
				32 - 45
				32 - 45
B17 B18 B19 B20			3,5 mg DAS/ kg/KGW, 15. Woche, subkutan	8 - 21
				8 - 21
				*
				27
B21 B22	Kontrolle	---	3,5 mg DAS/ kg/KGW, 15. Woche, subkutan	8 - 21
		---		8 - 21
B23 B24	Kontrolle	---	3,5 mg DAS/ kg/KGW, 15. Woche, oral	32 - 45
		---		8 - 21
B25 B26	Kontrolle	---	DMF/ Aqua dest.	*
		---		*
B27 B28	Kontrolle	---	Ethanol/ Olivenöl	*
		---		*

* = am 6. Tag nach der Toxinapplikation getötet

Versuch 3:

Wie aus der Abb. 10 ersichtlich ist, konnte durch die Restimulierung kein nennenswerter Antikörpertiteranstieg erzielt werden. Auch ein Vergleich zwischen intrakutaner und subkutaner Grundimmunisierung (Abb. 10 und 11) zeigt, daß durch beide Methoden etwa die gleichen Antikörpertiter erzielt werden konnten.

Im Blutbild änderten sich während des Versuchsverlaufes im wesentlichen die Werte der Leukozyten bzw. der Anteil der Lymphozyten und Segmentkernigen, so daß nur diese in Tabelle 11 berücksichtigt sind (lediglich kurz nach der Grundimmunisierung und Restimulierung kam es sehr vereinzelt zum Auftreten von Monozyten). Die Leukozytenwerte stiegen von durchschnittlich 6.100 pro μ l vor der Immunisierung auf etwa 9.000/ μ l 4 Tage nach der Grundimmunisierung und erreichten nach 6 Wochen wieder den Ausgangswert. Durch die Restimulierung kam es nochmals zu einem starken Leukozytenanstieg auf Werte über 10.000/ μ l nach 4 Tagen, jedoch durch den Belastungstest zu einer deutlichen Leukozytenreduzierung, so daß 6 Tage nach der Belastung nur ein Durchschnittswert von 3.700/ μ l festzustellen war. Der Lymphozytenanteil von 73 % vor der Immunisierung bewegte sich während des Versuchsverlaufes zwischen 55 und 58 %, fiel aber nach der Belastung auf durchschnittlich 42 %. Demgegenüber stieg der Anteil der Segmentkernigen von 26 % vor der Immunisierung über 39 - 45 % während des Versuchs auf 58 % nach der Belastung (Tabelle 12).

Wie schon in den vorausgegangenen Versuchen konnten in den ersten Stunden nach der Belastung keine klinischen Symptome festgestellt werden. Am nächsten Tag wurden die 3 nicht immunisierten, subkutan belasteten Kontrolltiere, 2 oral belastete Kontrolltiere sowie 1 nicht immunisiertes, subkutan belastetes Tier tot aufgefunden. Das noch lebende Kontrolltier zeigte ein

Ext.

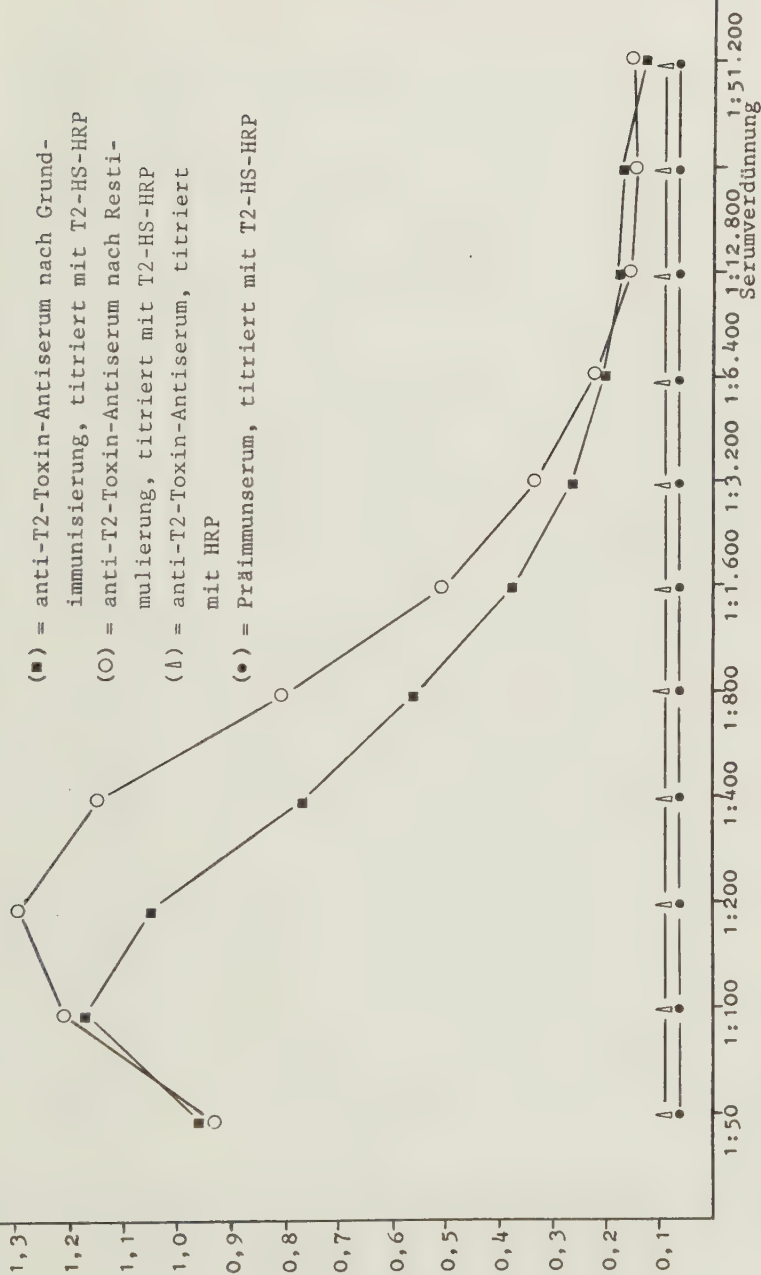


Abb. 10: Antiserumtiter gegen T2-Toxin im direkten ELISA (intrakutane Grundimmunisierung und Restimulierung, Meerschweinchen)

Ext.

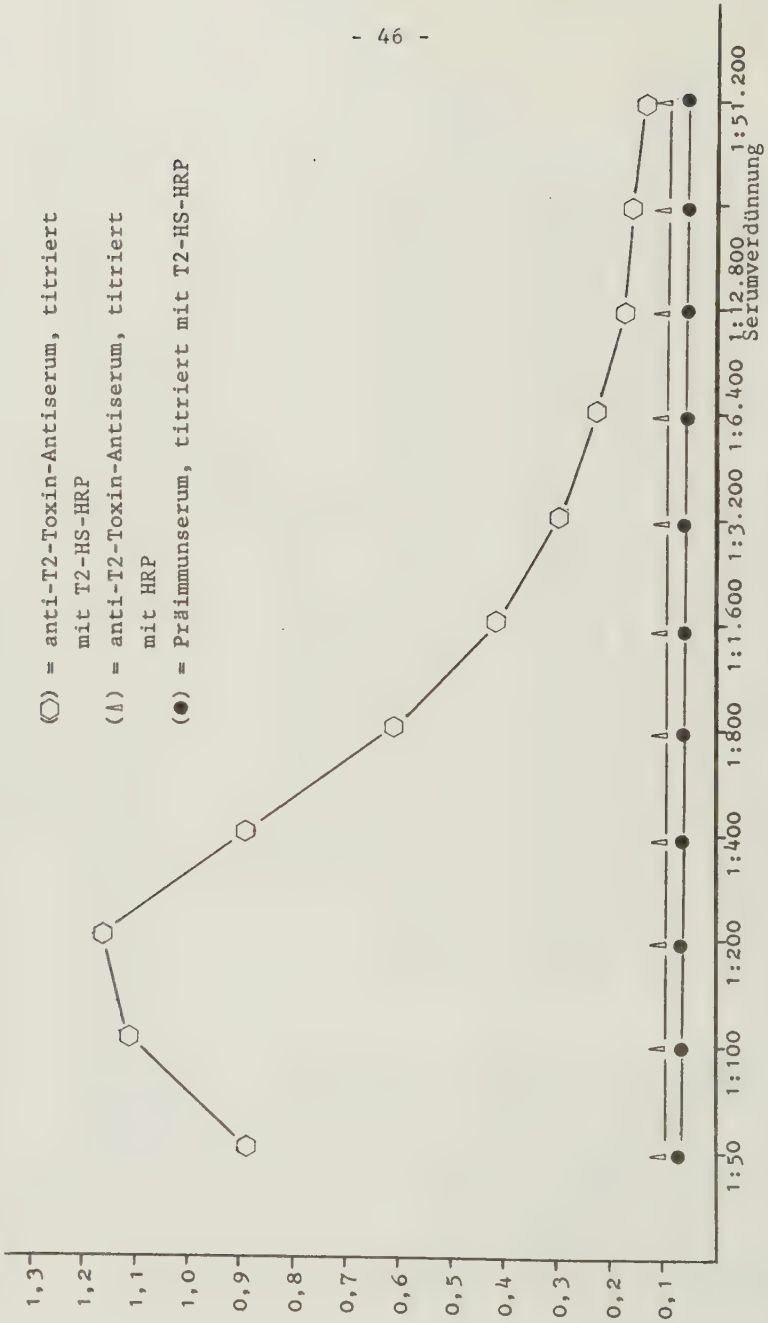


Abb. 11: Antiserumtiter gegen T2-Toxin im direkten ELISA (subkutane Grundimmunisierung, Meerschweinchen)

Tabelle 12: Durchschnittliche Blutzellwerte (pro μl), Meerschw.

BLUTENTNAHME	Leuko	ANTEIL (%)	
		Lympho	Segm.
vor der Immunisierung	6.100	73	26
4 Tage nach der Grund- immunisierung	8.900	58	39
10 Tage nach der Grund- immunisierung	8.100	55	42
6 Wochen nach der Grund- immunisierung	6.000	55	45
4 Tage nach Restimulierung	10.700	55	43
2 Wochen nach Restimulierung	7.000	56	43
6 Tage nach der Belastung	3.700	42	58

Leuko = Leukozyten pro μl

Lympho = Lymphozyten

Segm. = Segmentkernige

stark reduziertes Allgemeinbefinden, gesträubtes Fell und es waren weder Wasser- noch Futteraufnahme zu beobachten. Von den immunisierten Tieren zeigten 4 subkutan belastete ebenfalls ein reduziertes Allgemeinbefinden (C8, C10, C14 und C17) sowie eine leichte Konjunktivitis. Alle anderen Tiere waren völlig normal. Am darauffolgenden Tag wurden die Tiere C14, C17 und das Kontrolltier C19 tot aufgefunden. Die Tiere C10 und C12 fielen durch ihr gesträubtes Fell auf. Am 3. Tag verendeten die immunisierten, subkutan belasteten Tiere C6 und C12 nach vorausgegangener völliger Apathie. Alle anderen im Versuch stehenden Meer-schweinchen zeigten keinerlei Besonderheiten (Tabelle 13).

Die bei der Obduktion der verendeten Tiere erhobenen makrosko-pischen Befunde waren identisch mit den oben beschriebenen, wobei die Tiere C14, C19 und C20 durch zusätzliche petechiale Blutungen in der Magenschleimhaut auffielen. Auch lag wieder bei 2 Tieren (C20 und C21) eine schaumige Beschaffenheit des Caecuminhaltes vor. Bei den am Versuchsende getöteten Tieren waren makroskopisch keinerlei Veränderungen festzustellen.

Tabelle 13: Aktive Immunisierung gegen T2-Toxin und Belastungsversuch (Meerschweinchen)

TIER	GRUNDIMMUNISIERUNG	RESTIMULIERUNG	BELASTUNG (14. Woche)	TOD in h nach Belastung
C1	100 µg T2-HS-BSA, intrakutan	8. Woche subkutan	4,4 mg T2-	*
C2			Toxin/kg/	*
C3			KGW, oral	*
C4			4,4 mg T2-	8 - 22
C5		---	Toxin/kg/	*
C6			KGW, s.c.	74
C7			4,4 mg T2-	*
C8			Toxin/kg/	*
C9			KGW, oral	*
C10			4,4 mg T2-	*
C11			Toxin/kg/	*
C12			KGW, s.c.	73
C13	4,4 mg T2-		*	
C14	100 µg T2-HS-BSA, subkutan		Toxin/kg/	30 - 45
C15			KGW, oral	*
C16			4,4 mg T2-	*
C17		Toxin/kg/	30 - 45	
C18		KGW, s.c.	*	
C19		4,4 mg T2-	30 - 45	
C20		Toxin/kg/	8 - 22	
C21		KGW, oral	8 - 22	
C22	Kontrolle	4,4 mg T2-	8 - 22	
C23		Toxin/kg/	8 - 22	
C24		KGW, s.c.	8 - 22	

s.c. = subkutan

* = am 6. Tag nach der Toxinapplikation getötet

Versuch 4:

Da der Verdacht bestand, daß im gewonnenen Antiserum evtl. auch Antikörper gegen BSA vorhanden sind, die dann im indirekten ELISA mit dem zur Absättigung eingesetzten BSA reagieren, wurde zusätzlich ein direkter heterologer ELISA durchgeführt, bei dem diese Reaktionen weitestgehend ausgeschlossen werden können. Das Prinzip des heterologen ELISA, das Enzymkonjugat mit einem dem Immunogen nah verwandten Toxin herzustellen, das sich von jenem nur durch eine funktionelle Gruppe unterscheidet (HT2-Toxin), wurde am Institut erarbeitet (MÄRTLBAUER und TERPLAN, 1986), es wird an anderer Stelle berichtet (ESGIN). Die Reaktion der Mäuseseren ist aus Abb. 12 ersichtlich. Es ist nicht auszuschließen, daß im indirekten ELISA mit der Festkörperphase T2-HS-BSA Reaktionen mit nicht gegen T2-Toxin gerichtete Antikörper stattgefunden haben. Mit dem heterologen ELISA (HT2-HRP; andere Kopplungsmethode) kann jedoch gezeigt werden, daß Antikörper gegen T2-Toxin im Mäuseserum vorhanden waren.

Wie schon in den früheren Versuchen mit Meerschweinchen, konnten in den ersten Stunden nach der Belastung keine klinischen Symptome an den Tieren festgestellt werden. Auch in diesem Versuch waren reduziertes Allgemeinbefinden und gesträubtes Fell die ersten klinischen Symptome, die später auffielen und dann durch starke Bewegungsstörungen und völlige Apathie kurz vor dem Tod gekennzeichnet waren. Der Zeitpunkt des Todes der einzelnen Tiere ist aus Tabelle 14 ersichtlich. Bemerkenswert ist, daß von den immunisierten, oral belasteten Mäusen nur 1, von den intraperitoneal belasteten jedoch 4 Tiere überlebten.

Die makroskopischen Befunde sind mit denen für die vorangegangenen Versuche beschriebenen vergleichbar, wobei die petechialen Blutungen in der Magenschleimhaut bei den oral belasteten Tieren stärker ausgeprägt und auch in der Darmschleimhaut nachzuweisen waren. Bei den am Versuchsende getöteten Tieren waren makroskopisch keine pathologischen Veränderungen feststellbar.

Ext.

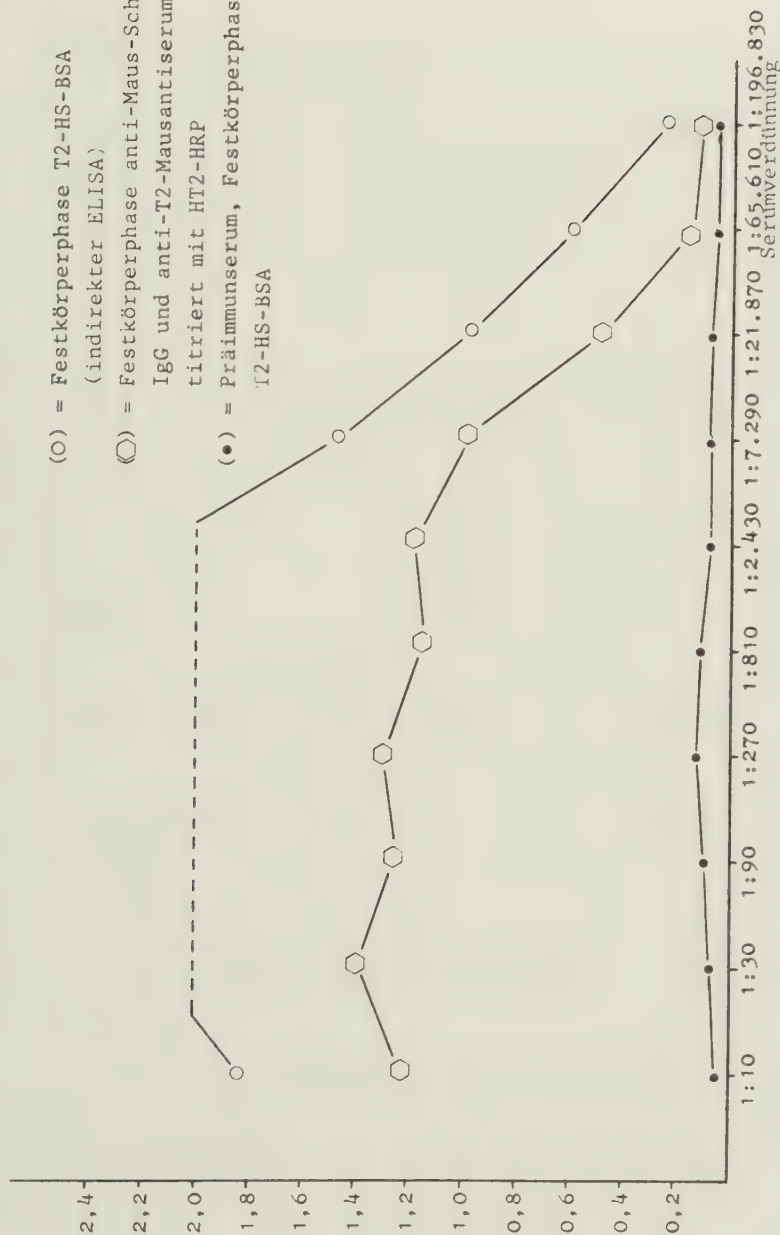


Abb. 12: Antiserumtiter gegen T2-Toxin (nach je einer subkutanen und intraperitonealen Immunisierung, Maus)

Tabelle 14: Aktive Immunisierung gegen T2-Toxin und Belastungsversuch (Maus)

TIER	IMMUNISIERUNG	BELASTUNG	TOD in h nach Belastung
M1	100 µg T2-HS-BSA, intraperitoneal	16 mg T2-Toxin pro kg KGW, 14. Woche, oral	5 - 20
M2			5 - 20
M3			24
M4			26
M5			51
M6			*
M7	Kontrolle	8 mg T2-Toxin pro kg KGW, 14. Woche, intraperitoneal	5 - 20
M8			22
M9			5 - 20
M10	5 - 20		
M11	26		
M12	*		
M13	*		
M14	*		
M15	*		
M16	Kontrolle		5 - 20
M17			29 - 44
M18			29 - 44

Die Tiere M1 mit M6 sowie M10 mit M15 waren vorher mit Mengen zwischen 5 und 50 µg des gleichen Antigens einmal behandelt worden.

* = am 7. Tag nach der Toxinapplikation getötet

3.2 Passive Immunisierung

Die ursprüngliche Absicht auch gegenüber DAS passiv zu immunisieren konnte nicht verwirklicht werden, da die immunisierten Kaninchen kein geeignetes Antiserum gegen DAS produzierten. Die Untersuchungen zur passiven Immunisierung wurden deshalb auf T2-Toxin beschränkt.

3.2.1 Material

Als Versuchstiere wurden männliche Albinomeerschweinchen (Fa. IVANOVAS) verwendet, die bei Versuchsbeginn ein Gewicht von 500 - 550 Gramm hatten. Als Antiserumspender dienten zugekaufte Kaninchen der Rasse "Deutsche Riesenschecke" (heterologes Antiserum), später wurde auch homologes Antiserum verwendet, das aus den zur aktiven Immunisierung eingesetzten Meerschweinchen gewonnen worden war (siehe 3.1.2.2.2). Gehalten wurden die Tiere bei einer Standarddiät (Fa. ALTROMIN) und Wasser.

Das zur aktiven Immunisierung der Spendertiere eingesetzte T2-Toxin-BSA-Konjugat sowie das in den Belastungsversuchen eingesetzte T2-Toxin wurden von der Fa. SIGMA erworben.

Alle anderen Chemikalien wurden von der Fa. MERCK in der Reinheitsstufe p.A. bezogen.

Die verwendeten Puffer bzw. Waschlösung sind in ihrer Zusammensetzung unter 3.1.1 beschrieben.

3.2.2 Methodik

Die passive Immunisierung wurde in 2 Versuchsabschnitten durchgeführt, wobei im ersten Kaninchen als Antiserumspender dienten (heterologes Antiserum), im zweiten von Meerschweinchen (siehe 3.1

insbesondere 3.1.2.2.2) produziertes homologes Antiserum eingesetzt wurde.

3.2.2.1 Immunisierung von Kaninchen

Für die passive Immunisierung wurden 2 Kaninchen nach der Methode von NIESCHLAG (1974) immunisiert. Pro Tier wurden hierbei 300 µg T2-HS-BSA in 0,5 ml 0,9%iger NaCl und 1,5 ml komplettem Freund'schen Adjuvans, dem 20 mg M. tuberculosis zugesetzt waren (beide Fa. DIFCO), emulgiert (siehe 3.1.2.2.2). In der 6. und 9. Woche wurden aus der Ohrarterie Blutproben (ca. 8 ml pro Tier) entnommen (BIERMANN, 1980) und nach der Aufbereitung (siehe 3.1.2.2.2 und 3.1.2.3.1) deren Antikörpertiter bestimmt. Diese Immunisierung geschah im Rahmen weiterer Untersuchungen im Hause, das so gewonnene Antiserum wurde für die hier beschriebenen Versuche zur Verfügung gestellt.

3.2.2.2 Antikörpernachweis mittels direktem ELISA

Die gereinigten Seren wurden in einem direkten ELISA eingesetzt (siehe 3.1.2.3.6), wobei die Absättigung der Platten mit PBS/BSA 3 % erfolgte. Das Konjugat T2-HS-HRP wurde durch die gemischte Anhydridmethode hergestellt (siehe 3.1.2.3.3) und in einer Verdünnung von 1:400 (in PBS/BSA 3 %) eingesetzt. Der Substratpuffer enthielt pro 100 ml 271 mg oPD und 51 µl 30%iges H₂O₂ (ESGIN, 1983).

3.2.2.3 Belastungsversuche

3.2.2.3.1 Applikation von heterologem Antiserum und T2-Toxin

In diesem Versuch wurden 22 Meerschweinchen (Tier Nr. B29 mit B50) in 3 Gruppen eingeteilt: in Gruppe 1 erhielten 8 Tiere Antiserum gleichzeitig mit T2-Toxin, in Gruppe 2 wurde 8 Tieren

T2-Toxin verabreicht und nach 4 h Antiserum appliziert, in Gruppe 3 erhielten 6 Tiere das Toxin 4 h nach der Antiserumverabreichung. In allen Fällen wurde das aus Kaninchen gewonnene Antiserum in einer Menge von 1 ml pro Meerschweinchen intraperitoneal appliziert. Die Belastungsdosis von 3,5 mg T2-Toxin pro kg KGW wurde der einen Hälfte der Tiere einer Gruppe oral (gelöst in DMF/Aqua dest.) der anderen Hälfte subkutan (gelöst in Ethanol/Olivenöl) verabreicht (siehe 3.1.2.4.1). Als Kontrolltiere dienten die Meerschweinchen B9 mit B12, denen nur das Toxin subkutan bzw. oral verabreicht wurde, sowie die Tiere B25 mit B28, denen nur das Lösungsmittel DMF/Aqua dest. bzw. Ethanol/Olivenöl appliziert wurde (Tabelle 15).

3.2.2.3.2 Applikation von homologem Antiserum und T2-Toxin

In einem zweiten Versuch zur passiven Immunisierung sollte überprüft werden, inwieweit durch Verabreichung von homologem Antiserum und simultaner Belastung eine Schutzwirkung erzielt werden kann.

Gereinigte Antiseren aus den Versuchen zur aktiven Immunisierung, deren Antikörpertiter durch einen direkten ELISA bestimmt worden waren (siehe 3.1.2.3.6 und 3.1.3), wurden gepoolt.

Den Meerschweinchen C25 mit C30 wurden je 4 ml homologes Antiserum intraperitoneal appliziert, wobei je 3 Tieren gleichzeitig T2-Toxin oral bzw. subkutan verabreicht wurde (4,4 mg T2-Toxin pro kg KGW). Zur oralen Toxinapplikation war das Toxin in DMF/Aqua dest., zur subkutanen in Ethanol/Olivenöl gelöst (siehe 3.1.2.4.1). Als Kontrollen dienten die Tiere C19 mit C24, denen das Toxin oral bzw. subkutan verabreicht wurde, jedoch ohne simultane Antiserumgabe (Tabelle 16).

3.2.2.3.3 Beobachtung der Tiere

Bis zur 8. Stunde nach der Toxin- bzw. Antiserumgabe erfolgte eine laufende Kontrolle der Tiere. Ab der 21. Stunde bis zur 32. Stunde (in Versuch 2 von der 20. bis 30. Stunde) wurde ebenfalls stündlich kontrolliert, danach 4mal am Tag. Am 6. Tag nach Beginn der Belastungsversuche wurden die noch lebenden Tiere getötet (T61[®] intracardial).

3.2.3 Ergebnisse

Versuch 1 (heterologes Antiserum)

Antikörpertiter und Toxinbindungsvermögen

Die Titration des gereinigten anti-T2-Kaninchenantisera ergab einen Antikörpertiter von 1:3.200 (siehe Abb. 13) (ESGIN, 1983). Die Untersuchung zur toxinbindenden Wirkung des anti-T2-Antisera ergab eine 50%ige Sättigung der Antikörperbindungsstellen in der beschriebenen Testanordnung bei einer Toxinkonzentration von ca. 1 ng T2-Toxin/ml (Abb. 14).

Belastungsversuch

Wie schon bei den Versuchen zur aktiven Immunisierung konnten in den ersten Stunden nach der Toxinverabreichung keinerlei klinische Symptome festgestellt werden. Zwischen der 8. und 21. Stunde verendeten mit Ausnahme von Tier B44 alle subkutan belasteten Meerschweinchen der 3 Gruppen, einschließlich der subkutan belasteten Kontrollen. Im Beobachtungszeitraum von der 22. bis 32. Stunde zeigte das noch lebende subkutan belastete Tier B44 ein gesträubtes Fell und wirkte apathisch. Von den oral belasteten Tieren zeigten zu diesem Zeitpunkt ein Tier aus Gruppe 2 (Toxingabe 4 h nach der Antiserumverabreichung), alle 3 Tiere, denen das Toxin 4 h vor der Antiserumgabe verabreicht worden war sowie beide Kontrollen ähnliche Symptome. In der darauffolgenden Nacht (32. bis 45. Stunde) verendeten die beiden Kontrollen (B11, B12), alle 3 Tiere der Gruppe 3, zwei aus Gruppe 2 und ein Meerschweinchen aus Gruppe 1. Alle anderen Tiere erholten sich und wurden am 6. Tag nach der Belastung getötet (Tabelle 15).

Auf die Beschreibung der makroskopischen Befunde der verendeten bzw. getöteten Tiere wird verzichtet, da sie identisch mit denen der Belastungsversuche zur aktiven Immunisierung sind (siehe 3.1.3).

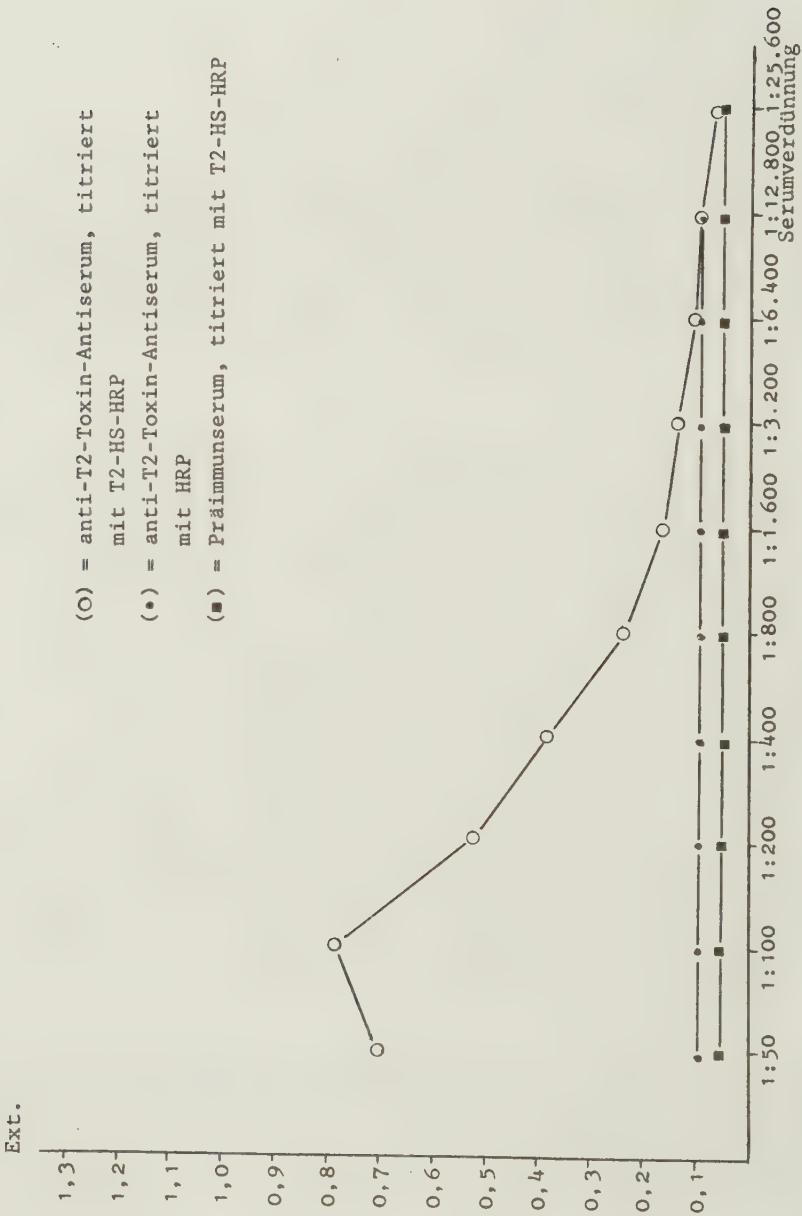


Abb. 13: ELISA-Titrationskurve für anti-T2-Toxin-Antiserum (Kaninchen)

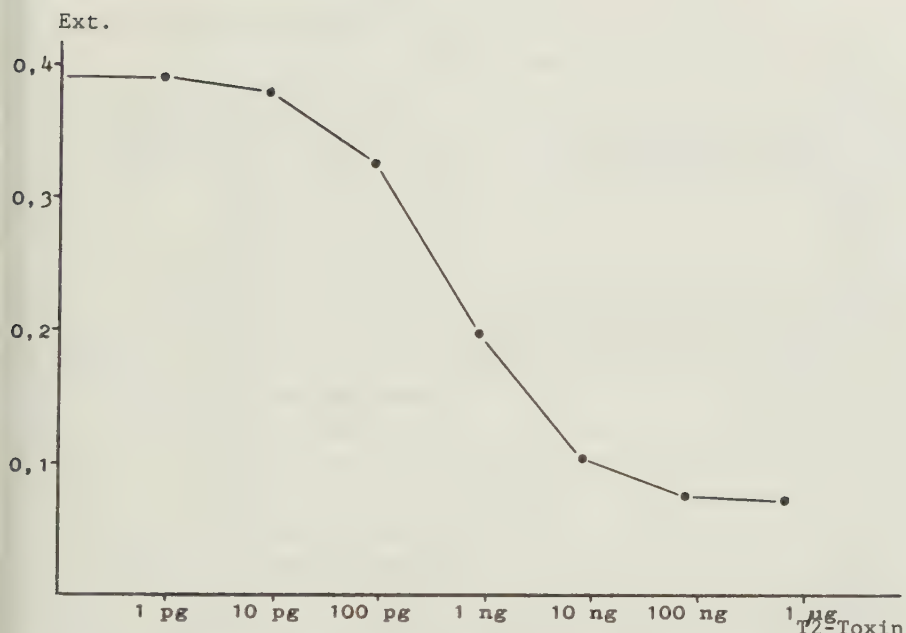


Abb. 14: Hemmung der Bindung des T2-HS-HRP-Konjugates an das Immunosorbens durch freies Toxin

Aus Tabelle 15 ist ersichtlich, daß bei subkutaner Belastung durch passive Immunisierung, gleich zu welchem Zeitpunkt das Toxin verabreicht wurde, nur ein unwesentlicher Schutz erzielt werden konnte. Lediglich bei den oral belasteten Tieren, denen gleichzeitig oder 4 h zuvor das Antiserum injiziert worden war, zeigte sich eine gewisse Schutzwirkung.

Tabelle 15: Passive Immunisierung gegen T2-Toxin und Belastungsversuch (Meerschweinchen)

TIER	ANTISERUMGABE (AS) (Kaninchenantiserum)	BELASTUNG T2-Toxin	TOD in h nach Belastung
B29	1 ml AS, intraperitoneal, gleichzeitig mit Toxinappl.	3,5 mg pro kg KGW, oral	*
B30			*
B31			*
B32			32 - 45
B33		3,5 mg pro kg KGW, subkutan	8 - 21
B34			8 - 21
B35			8 - 21
B36			8 - 21
B37		3,5 mg pro kg KGW, oral	*
B38			32 - 45
B39			32 - 45
B40	*		
B41	1 ml AS, intraperitoneal, 4 h vor Toxinappl.	3,5 mg pro kg KGW, subkutan	8 - 21
B42			8 - 21
B43			8 - 21
B44			*
B45	1 ml AS, intraperitoneal, 4 h nach Toxinappl.	3,5 mg pro kg KGW, oral	32 - 45
B46			32 - 45
B47			32 - 45
B48			8 - 21
B49		3,5 mg pro kg KGW, subkutan	8 - 21
B50			8 - 21
B9			8 - 21
B10			8 - 21
B11	Kontrolle, kein AS	3,5 mg/kg/ KGW, oral	32 - 45
B12			32 - 45
B25		DMF/	*
B26		Aqua dest.	*
B27		Ethanol/	*
B28		Olivenöl	*

* = am 6. Tag nach der Toxinapplikation getötet

Versuch 2 (homologes Antiserum)

Antikörpertiter

Das hierbei eingesetzte anti-T2-Meerschweinchenantiserum hatte einen Antikörpertiter von 1:6.400 (siehe 3.1.3 insbesondere Versuch 2 und 3).

Belastungsversuch

In den ersten Stunden nach der Toxinverabreichung waren bei keinem Tier klinische Symptome feststellbar. Am nächsten Tag wurden 1 oral (C25), 1 subkutan belastetes Meerschweinchen (C30) und die Kontrollen mit Ausnahme von C19 tot aufgefunden. Zu diesem Zeitpunkt zeigten die noch lebenden Tiere gesträubte Felle und reduziertes Allgemeinbefinden, bei C28 und C29 (subkutan belastet) zudem leichte Konjunktivitiden. Im Laufe des Tages verschlechterte sich bei Tier C28 der Allgemeinzustand sehr stark bis zur völligen Apathie; es verendete am 2. Tag (72 h nach der Toxinapplikation). Bis auf das Kontrolltier C19, das zwischen der 30. und 45. Stunde verendete, hatten sich alle anderen Tiere wieder völlig erholt. Am 5. Tag wurde das Tier C26 tot aufgefunden (der Tierkörper war noch nicht erkaltet) (Tabelle 16).

Bei der Obduktion von Tier C26 konnten stärkere Blutansammlungen in Herzbeutel und Brusthöhle festgestellt werden, deshalb dürfte die Todesursache nicht auf die Toxinwirkung zurückzuführen sein, eher auf ein von außen einwirkendes Trauma. Die makroskopischen Befunde der verendeten bzw. am Versuchsende getöteten Tiere waren wiederum identisch mit denen der vorangegangenen Versuche (3.1.3).

Tabelle 16: Passive Immunisierung gegen T2-Toxin und Belastungsversuch (Meerschweinchen)

TIER	ANTISERUMGABE (AS) (Meerschw.-Antiserum)	BELASTUNG	TOD in h nach Belastung
C25	4 ml AS, intraperitoneal, gleichzeitig mit Toxin	4,4 mg T2-Toxin/kg/KGW, oral	8 - 22
C26			5.Tag **
C27			*
C28		4,4 mg T2-Toxin/kg/KGW, subkutan	72
C29			*
C30			8 - 22
C19	Kontrolle, kein AS	4,4 mg T2-Toxin/kg/KGW, oral	30 - 45
C20			8 - 22
C21			8 - 22
C22		4,4 mg T2-Toxin/kg/KGW, subkutan	8 - 22
C23			8 - 22
C24			8 - 22

* = am 6. Tag nach Toxinapplikation getötet

** = Tod vermutlich durch traumatische Einwirkung

4 Diskussion

Trichothecene, die Stoffwechselprodukte bestimmter Schimmelpilze, sind äußerst toxisch für Mensch und Tier. Seit deren Entdeckung wird immer wieder über Schäden in der Nutztierhaltung berichtet, die durch die Aufnahme von kontaminierten Futtermitteln verursacht werden. Es müssen deshalb neben der Entwicklung von geeigneten, empfindlichen Nachweismethoden auch Überlegungen über einen möglichen Schutz gegen diese Mykotoxine angestellt werden. In der Literatur war bisher eine Immunisierung gegen diese Toxine nur zur Produktion von Antikörpern zu diagnostischen Zwecken beschrieben worden. Da am Institut im Rahmen von Forschungsprogrammen Immunogene zur Produktion von Antisera gegen einige Trichothecene zu diagnostischen Zwecken hergestellt wurden, boten sich diese an Proteinträger gebundenen Toxine auch zur aktiven bzw. die gewonnenen Seren auch zur passiven Immunisierung an, um damit die Möglichkeit eines immunologisch bedingten Schutzes zu studieren.

Im ersten Versuchsabschnitt zur aktiven Immunisierung wurden die Toxine nach der Methode von CHU et al. (1979) in Hemisuccinate überführt (3.1.2.1.1) und diese Umsetzung dünnschichtchromatographisch überprüft. Durch das Laufmittel Toluol:Ethylacetat (25:75) konnte eine gute Auftrennung von T2-HS bzw. DAS-HS und T2-Toxin bzw. DAS erreicht werden.

Die Kopplung der so gewonnenen Toxin-Hemisuccinate an ein Trägerprotein erfolgte nach der Carbodiimid-Methode von CHU et al. (1977) (3.1.2.1.2), ebenso die Enzymmarkierung der Toxine mit Meerrettichperoxidase (3.1.2.3.2). Im ersten Versuch konnte mittels des indirekten ELISA zwar eine Antikörperbildung festgestellt werden, jedoch stellte sich beim direkten ELISA heraus, daß freies T2-Toxin bzw. DAS durch das Antiserum nicht gebunden wurde. Folgende Erklärung bietet sich für diese scheinbar paradoxe Eigenschaft des Antiserums an: Durch die Immunisierung mit einem Toxin-Protein-Konjugat werden im Organismus Antikörper ge-

gen das Toxin, das Trägerprotein und die Bindungsstelle dieser beiden Moleküle gebildet. Außerdem können Antikörper gebildet werden, die gegen das zur Kopplung eingesetzte und im Immunogenpräparat noch vorhandene Reagens gerichtet sind, wenn dieses sich ebenfalls an das Trägerprotein bindet. So reagierten vermutlich im 1. Versuch überwiegend Antikörper mit einem oder mehreren Epitopen des Toxin-Hemisuccinat-Meerrettichperoxidase-Konjugates, die durch das Reagens Carbodiimid bedingt waren (und auch in dem Toxin-hemisuccinat-Hühnerserumalbumin-Konjugat, das als Immunogen verwendet worden war, entstanden waren) und nur in geringem Maße mit den eingesetzten Toxinen, dieses gilt speziell für den Antikörpernachweis bei den gegen DAS immunisierten Tieren.

Deshalb erwies es sich, wie im Rahmen weiterer Untersuchungen im Hause festgestellt wurde (MARTLBAUER und TERPLAN, 1980), als notwendig, bei der Herstellung von Immunogen (Impfkongugat) und mar-kierten Enzym (Enzymkongugat) als ELISA-Reagens unterschiedliche Kopplungsverfahren anzuwenden, um damit Reaktionen verschiedener nicht spezifischer, gegen Bindungsstellen etc. gerichteter Antikörper auszuschließen. In den weiteren Versuchen wurde daher ein Toxin-Enzymkongugat verwendet, bei dem die Kopplung mittels der gemischten Anhydrid-Methode (PFAN et al., 1972) (3.1.2.3.3) erfolgte. Als Immunogen wurde das Präparat der Fa. SIGMA verwendet (T1-BS-BSA). Mit dieser Kombination konnten nach Herstellung neuer Antiseren im direkten ELISA spezifische Antikörper gegen T1-Toxin nachgewiesen werden, und zwar nachträglich auch in den Seren der im 1. Versuch gegen T1-Toxin immunisierten Tiere. Daß die Bindung des Toxin-Peroxidase-Konjugates an das Immunsorbens auch von der Wahl des Puffers abhängt, wurde im Rahmen anderer Untersuchungen am Institut festgestellt. Ein Vergleich zwischen TBSN 10-, FCS- und BSA-Einsatz zum Enzymkongugat zeigt, daß durch BSA-Egabe die beste Bindung erreicht werden konnte (siehe 3.1.3) (ESGIN).

Sowohl im ersten Versuch (10 µg) als auch im zweiten Versuch bei Einholung der Impfdosis auf 100 µg Toxin-Hemisuccinat-Protein pro Tier konnten höchstens lokale Reaktionen aber keine Beeinträchti-

gung des Allgemeinzustandes der Tiere beobachtet werden.

Der Versuch, durch intranasale Grundimmunisierung Antikörper zu gewinnen, wurde abgebrochen, da trotz viermaliger Wiederholung der Grundimmunisierung keine Antikörper mittels ELISA festgestellt werden konnten (3.1.2.2.1).

Da in den Versuchen 1 und 2 trotz dreimaliger bzw. einmaliger Restimulierung kein nennenswerter Unterschied im Antikörpertiter festgestellt werden konnte, sollte im Versuchsabschnitt 3 geprüft werden, inwieweit die Applikationsart bei der Grundimmunisierung einen Einfluß auf den Antikörpertiter ausübt. Sowohl bei intrakutaner als auch bei subkutaner Grundimmunisierung konnten etwa die gleichen Antikörpertiter nachgewiesen werden (3.1.3).

In Versuch 4 zur aktiven Immunisierung wurden Mäuse als Versuchstiere eingesetzt, um die Frage zu klären, inwieweit die bei Meerschweinchen erzielten Ergebnisse auf eine andere Tierart übertragen werden können. Mit Impfdosen von 5 - 50 µg T2-HS-BSA subkutan pro Tier (3.1.2.2.1) konnten keine nachweisbaren Antikörper induziert werden, während nach dem Einsatz von 100 µg T2-HS-BSA intraperitoneal bereits 2 Wochen später spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten.

Nach der Grundimmunisierung sowie nach der Restimulierung kam es zu einer deutlichen Leukozytenzunahme (3.1.3), wie dies auch von SATO et al. (1975) bei Katzen und KRIEGLEDER (1980) bei Meerschweinchen nach der Applikation von T2-Toxin festgestellt wurde. Im Anschluß an die Belastung erfolgte eine deutliche Depression der Leukozytenzahl, wie sie unter anderem auch von DE NICOLA et al. (1978), JAGADEESAN et al. (1982) und LUTSKY et al. (1978), vornehmlich für chronische Intoxikationen beschrieben wurde. Die Verminderung der Leukozyten dürfte auf die Schädigung der Bildungsstätten dieser Zellen zurückzuführen sein, wie dies auch mehrere Autoren festgestellt haben (DE NICOLA et al. 1978; STÄHELIN et al., 1968; SATO et al., 1975; UENO et al., 1972; WEAVER et al., 1978). Diese Veränderungen im Blutbild waren während des Versuchs auch bei den immunisierten Tieren vorhanden, die offensichtlich einen Immunschutz aufwiesen und die Belastung überlebten.

Bei den nicht immunisierten Kontrolltieren trat der Tod relativ rasch ein, wobei subkutan belastete durchschnittlich eher verendeten als oral belastete (siehe Tabellen 8, 9, 10, 11, 13 und 14). Dieses gilt grundsätzlich auch für die immunisierten Tiere, bei denen die subkutan belasteten häufiger nicht überlebten als die Tiere, denen das Toxin oral verabreicht worden war. Wenn auch die 3 Versuche an Meerschweinchen nicht direkt miteinander verglichen werden können, so deutet sich doch die Tendenz an, daß die Grundimmunisierung allein einen zumindest gleichwertigen Immunschutz vermittelt gegenüber den ein- oder mehrfach restimulierten Tieren. So überlebten im 3. Versuch 9 von 12 nicht restimulierten Tieren gegenüber 4 von 6 einmalig restimulierten. Die Tatsache, daß im 1. Versuch keines der immunisierten Tiere überlebte, könnte verschiedene Gründe haben: die Grundimmunisierung erfolgte mit einer 10fach geringeren Dosis als bei den übrigen Versuchen; in diesem Versuch wurde auch ein anderes Antigen als in den späteren verwendet. Die 3malige Restimulierung muß sich nicht im Sinne eines stärkeren Immunschutzes ausgewirkt haben. So könnte u.U. sogar eine immunsuppressive Wirkung des Toxins vorgelegen haben, das nach HUNTER (1985) aus dem zur Immunisierung und Restimulierung eingesetzten Toxin-Protein-Konjugat abgespalten wird. Schließlich ist als letzter Grund für den Tod aller immunisierten Tiere im 1. Versuch noch in Erwägung zu ziehen, daß zwar eine gewisse Schutzwirkung vorgelegen haben kann, daß aber die während der Belastung herrschenden außergewöhnlichen ungünstigen klimatischen Verhältnisse die Toxinwirkung synergistisch beeinflußt haben.

Im Versuch mit Mäusen, in dem ebenfalls ca. das 1 1/2fache der LD₅₀ gewählt wurde und die pro kg KGW deutlich höher als beim Meerschweinchen liegt, starben bei oraler Belastung (16 mg Toxin pro kg KGW) prozentual mehr Tiere als im Meerschweinchenversuch. 2 und 3. Ein besseres Ergebnis konnte bei intraperitonealer Belastung (8 mg Toxin pro kg KGW) erzielt werden (Tabelle 14), wobei sich die Frage nach einem lokal bedingten Immunschutz ergibt, da die Mäuse alle intraperitoneal immunisiert worden waren.

Die aktive Immunisierung gegen DAS verlief unbefriedigend; im 1. Versuch verendeten alle immunisierten Tiere nach relativ kurzer Zeit. Von den Gründen, die für das Fehlen eines ausreichenden Immunschutzes in Betracht kommen und beim T2-Toxin erwähnt wurden, ist in erster Linie die Qualität des Antigens zu nennen. Diese Annahme wird auch durch die Tatsache bestärkt, daß im direkten ELISA das durch dieses Antigen induzierte Antiserum nicht in der Lage war, DAS zu binden. Zu bemerken ist außerdem, daß die verabreichte Antigendosis nur 10 µg DAS-HS-HSA betrug und die Belastungsdosis 4,5 mg DAS. Auch im 2. Versuch bei der 10fachen Antigendosis und einer geringeren Toxinbelastung überlebten lediglich je 1 oral und subkutan belastetes Tier. Die Schutzwirkung des Antigens dürfte aus den vorher erwähnten Gründen in diesem Versuch mangelhaft gewesen sein.

Die Beobachtung der Tiere nach der Belastung ergab in allen Versuchen vergleichbare Ergebnisse: keinerlei besondere klinische Symptome in den ersten Stunden nach der Toxinapplikation, Wasser- und Futteraufnahme waren normal (siehe auch 3.1.2.4.2 und 3.1.3). Später zunehmend reduziertes Allgemeinbefinden, gesträubtes Fell, keine Futter- und Wasseraufnahme sowie vereinzelt leichte Konjunktivitiden. Soweit es sich um belastete Kontrolltiere handelte, verendeten diese kurze Zeit später. Immunisierte Tiere, die den Belastungstest nicht überlebten, verfielen vor ihrem Tod in totale Apathie, während sich alle anderen erholten.

Die im Literaturteil der Arbeit erwähnten Tierversuche mit T2-Toxin und Diacetoxyscirpenol, bei denen morphologische Veränderungen nach der Toxinapplikation beschrieben sind, sind mit denen in dieser Arbeit genannten vergleichbar, soweit es sich um verendete Tiere handelt (DE NICOLA et al., 1978; KRIEGLER, 1980).

Bei der Obduktion der verendeten Kontrolltiere sowie der verendeten immunisierten Versuchstiere konnten für DAS und T2-Toxin

identische, wie unter anderem schon von DE NICOLA et al. (1978) und KRIEGLER (1980) beschrieben, makroskopische Befunde erhoben werden: in allen Fällen Hyperämie der großen Parenchyme bei unterschiedlich starker Betroffenheit der Milz, Hyperämie der Magenschleimhaut, petechiale Blutungen in der Magenschleimhaut, die bei oral belasteten Tieren meist stärker ausgeprägt waren. Bei den am Ende eines jeweiligen Versuchsabschnittes getöteten Tieren konnten makroskopisch keine pathologisch-anatomischen Veränderungen festgestellt werden.

Bei den Untersuchungen zur aktiven Immunisierung zeigte sich, daß gegen T2-Toxin ein deutlicher Immunschutz erzielt werden kann. Im Rahmen weiterer Untersuchungen müßte nun geprüft werden, wie der Immunschutz durch Modifikation des Antigens und dessen Verabreichung verbessert werden und bis zu welcher Belastungsdosis ein absoluter Schutz erreichbar ist.

Die ursprüngliche Absicht neben einer aktiven Immunisierung gegen die beiden Trichothecene T2-Toxin und Diacetoxyscirpenol auch eine passive Immunisierung zu studieren, mußte für Diacetoxyscirpenol zurückgestellt werden, da für letzteres kein geeignetes Antiserum produziert werden konnte. Die Gründe dafür wurden bereits bei der Diskussion der unbefriedigenden Versuche zur aktiven Immunisierung gegen DAS bzw. T2-Toxin erwähnt.

Die passive Immunisierung gegen T2-Toxin mit in Kaninchen produziertem Antiserum (3.2.2.1), wurde über die intraperitoneale Applikation (3.2.2.3.1) durchgeführt. Die Ergebnisse (Tabelle 15) zeigen, daß lediglich durch simultane Antiserum- und Toxinapplikation bei Meerschweinchen eine oral belastbare passive Immunität erzielt werden konnte. Bei einer Antiserumgabe 4 h nach der Toxinapplikation überlebte kein Tier, eine 4 h der Belastung vorausgegangene Antiserumgabe brachte ebenfalls nur einen sehr geringen Schutz gegenüber einer oralen Belastung. Der Grund dürfte in der raschen Wirkung des T2-Toxins liegen, so daß bei einer späteren

Antiserumverabreichung bereits schwerwiegende Läsionen bzw. Organschäden vorliegen, während die 4 h vor der Belastung verabreichten Antikörper bei der Toxinverabreichung nicht mehr in vollem Umfang wirksam sind.

Durch einen weiteren Versuch, in dem statt heterologem homologes Antiserum gleichzeitig mit der Toxinapplikation verabreicht wurde, konnte ebenfalls nur in der Gruppe der oral belasteten Tiere ein gewisser Schutz erzielt werden (Tabelle 16).

Die Beobachtung der Tiere und die bei der Obduktion der verendeten bzw. am Versuchsende getöteten Tiere erhobenen Befunde sind identisch mit jenen, die für die aktive Immunisierung beschrieben wurden.

Abschließend lassen die Experimente zur aktiven und passiven Immunisierung gegen Mykotoxine am Beispiel von T2-Toxin und DAS den Schluß zu, daß ein Schutz von Tieren gegen Mykotoxine, die mit dem Futter aufgenommen werden, durch aktive eventuell auch durch passive Immunisierung prinzipiell möglich ist.

5 Zusammenfassung

Am Beispiel der Trichothecene T2-Toxin und Diacetoxyscirpenol (DAS) wurde geprüft, ob ein Immunschutz gegen nicht immunogen wirksame Mykotoxine induziert werden kann. Um Versuchstiere gegen T2-Toxin bzw. DAS aktiv zu immunisieren, müssen diese Haptene nach Derivatisierung durch Kopplung an einen Proteinträger zu Antigenen modifiziert werden. Die in Hemisuccinate (HS) überführten T2-Toxin (T2-HS) und DAS (DAS-HS), die über die Carbodiimid-Methode an das Trägermolekül Humanserumalbumin (HSA) gekoppelt waren, standen für die Experimente zur Verfügung (T2-HS-HSA) bzw. wurden selbst hergestellt (DAS-HS-HSA). Diese Immunogene sowie käuflich erworbenes, an bovines Serumalbumin (BSA) gekoppeltes T2-Toxin (T2-HS-BSA) wurden zur aktiven Immunisierung von Meerschweinchen und Mäusen eingesetzt.

Der Erfolg der in verschiedenen Variationen vorgenommenen primären Immunogenverabreichung bzw. Restimulierung zur aktiven Immunisierung wurde in vitro mittels indirektem bzw. direktem ELISA und in vivo durch Belastung der Tiere mit den jeweiligen Toxinen geprüft.

In weiteren Versuchen wurde die passive Immunisierung von Meerschweinchen gegen T2-Toxin mit heterologem (Kaninchen-) und homologem (Meerschweinchen-) Antiserum untersucht.

Die durch einmalige Grundimmunisierung mit 100 µg T2-HS-BSA mittels direktem ELISA festgestellten Antikörpertiter für anti-T2-Toxin-Antiserum konnten auch durch Restimulierung nicht nennenswert gesteigert werden. Nach subkutaner Grundimmunisierung konnten etwa die gleichen Antikörpertiter wie nach intrakutaner Applikation des Immunogens gemessen werden.

Durch die aktive Immunisierung konnte gegen die Belastung mit T2-Toxin ein gewisser Immunschutz der Meerschweinchen erreicht werden, wobei nach oraler Toxinbelastung mehr Tiere überlebten als nach subkutaner. Bei Mäusen konnte lediglich ein geringer Schutz gegen T2-Toxin festgestellt werden.

Die passive Immunisierung gegen T2-Toxin erzeugte nur einen mäßigen Schutz der Tiere und auch nur bei simultaner Toxin-Antiserum-Verabreichung.

Die Immunisierung gegen DAS war weitestgehend erfolglos, vermutlich aufgrund eines ungeeigneten Antigens.

Im Blutbild zeigte sich ein Anstieg der Leukozyten kurz nach der Grundimmunisierung bzw. Restimulierung, dem jedoch eine deutliche Reduktion der Leuko- und Lymphozyten nach der Belastung folgte. Die Ergebnisse der aktiven Immunisierung lassen einen Immunschutz von Tieren gegen Schadwirkungen von Mykotoxinen im Futter als möglich erscheinen.

Summary

Examinations on the possibility of immunization against mycotoxins demonstrated by the examples of T2-toxin and diacetoxyscirpenol

In experiments with the trichothecenes T2-toxin and diacetoxyscirpenol (DAS) it was examined whether an immunological protection can be induced against non-immunologically effective mycotoxins. For active immunization of animals against T2-toxin or DAS these haptens have to be derivatized and linked to a protein carrier yielding the immunogen. T2-toxin- and DAS-hemisuccinates (T2-HS; DAS-HS) had been coupled to human serum albumin (HSA) as the protein carrier via the carbodiimide-method. For the experiments T2-HS-HSA was available, DAS-HS-HSA was prepared in the frame of these experiments. These immunogenes and commercially available T2-HS coupled to bovine serum albumin (T2-HS-BSA) were used for active immunization of guinea-pigs and mice.

The results of the different methods of active immunization and restimulation were tested in vitro by indirect and direct ELISA and in vivo by application of the corresponding toxins to the animals.

Additional investigations were made for testing the passive immunization of guinea-pigs with heterologous (rabbit-) and homologous (guinea-pig-) antisera against T2-toxin.

The antibody titres for anti-T2-toxin-antisera found by direct ELISA after a primary immunization (100 µg T2-HS-BSA) could not be significantly increased by restimulation. The same antibody titres were detected after subcutaneous and intracutaneous primary immunization.

A certain immunological protection of guinea-pigs against T2-toxin could be achieved by active immunization. More animals survived after oral than after subcutaneous application of the toxin. In mice only unsufficient protection against T2-toxin could be achieved.

The passive immunization against T2-toxin resulted in a moderate protection of the animals, if the toxin was administered simultaneously with the antiserum.

The immunization against DAS failed probably caused by an unsuitable antigen.

Shortly after primary immunization or restimulation the haemogram showed an increase of the leucocyte count which was followed by a distinct reduction of leucocytes and lymphocytes after toxin-application.

The results revealed that animals might be protected against toxic effects of mycotoxins in feedstuff by active immunization.

6 Literatur

Bamburg, J.R., W.F. Marasas, N.V. Riggs, E.B. Smalley und F.M. Strong (1968a):

Toxic spiroepoxy compounds from *Fusaria* and other hyphomycetes.
Biotechnol. Bioeng. 10, 445 - 455

Bamburg, J.R., N.V. Riggs und F.M. Strong (1968b):

The structures of toxins from two strains of *Fusarium tricinctum*.

Tetrahedron 24, 3329 - 3336

Bamburg, J.R., F.M. Strong und E.B. Smalley (1969):

Toxins from moldy cereals.

J. Agr. Food Chem. 17, 443 - 450

Bamburg, J.R. und F.M. Strong (1971):

12, 13-Epoxythrichothecenes

in S. Kadis, A. Ciegler und S.J. Ajl, Eds. Academic Press, N.Y.

Vol. 7, 207 - 292

Behringer, J. (1972):

Eignung des Hühnerembryonentests für den Nachweis von Mykotoxinen

Diss. med. vet., Universität München

Biermann, A. und G. Terplan (1980):

Nachweis von Aflatoxin B₁ mittels ELISA.

Arch. Lebensmittelhyg. 31, 51 - 57

Biermann, A. (1980):

Nachweis von Aflatoxin B₁ mittels ELISA.

Diss. med. vet., Universität München

Brian, P.W., A.W. Dawkins, J.F. Grove, H.G. Hemming, D. Lowe und G.L.F. Norris (1961):

Phytotoxic compounds produced by *Fusarium equiseti*.

J. Exp. Bot. 12, 1 - 12

Catt, K.J., G.W. Tregear, H.G. Burger und C. Skermer (1970):
Antibody-coated tube method for radioimmunoassay of human growth hormone.

Clin. Chim. Acta 27, 267 - 279

Chi, M.S., C.J. Mirocha, H.J. Kurtz, G. Weaver, F. Bates, W. Shimoda und H.R. Burmeister (1977a):

Subacute toxicity of T2-toxin in broiler chicks.

Poul. Sci. 56, 306 - 313

Chi, M.S., C.J. Mirocha, H.J. Kurtz, G. Weaver, F. Bates, W. Shimoda und H.R. Burmeister (1977b):

Acute toxicity of T2-toxin in broiler chicks and laying hens.

Poul. Sci. 56, 103 - 116

Chi, M.S. und C.J. Mirocha (1978a):

Necrotic oral lesions in chickens fed diacetoxyscirpenol, T2-toxin, and crotoxin.

Poul. Sci. 57, 807 - 808

Chi, M.S., T.S. Robison, C.J. Mirocha und K.R. Reddy (1978b):
Acute toxicity of 12, 13-epoxytrichothecenes in one-day-old broiler chickens.

Appl. Environ. Microbiol. 35, 636 - 640

Chu, F.S., F.C.C. Chang und R.D. Hinsdill (1976):

Production of antibody against ochratoxin A.

Appl. Environ. Microbiol. 31, 831 - 835

Chu, F.S., M.T.S. Hsia und P.S. Sun (1977):

Preparation and characterization of aflatoxin B₁-1-(O-carboxymethyl oxime).

JAOAC 60, 791 - 794

Chu, F.S. und I. Ueno (1977):

Production of antibody against aflatoxin B₁.

Appl. Environ. Microbiol. 33, 1125 - 1128

Chu, F.S., S. Grossman, Ru-Dong Wei und C.J. Mirocha (1979):

Production of antibody against T2-toxin.

Appl. Environ. Microbiol. 37, 104 - 108

Dean, P.D.G., P.H. Rowe und D. Exley (1972):

Preparation of oestriol-6-(O-carboxymethyl) oxime and oestrone-6-(carboxymethyl) oxime-bovine serum albumin conjugates.

Steroids Lipids Res. 3, 82 - 89

De Nicola, D.B., A.H. Rebar, W.W. Carlton und B. Yagen (1978):

T2-toxin mycotoxicosis in the guinea-pig.

Fd. Cosmet. Toxicol. 16, 601 - 609

Ellison, R.A. und F.N. Kotsonis (1973):

T2-toxin as an emetic factor in moldy corn.

Appl. Microbiol. 26, 540 - 543

Engvall, E. und P. Perlmann (1971):

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunglobulin G.

Immunochemistry 8, 871 - 874

Esgin, S. (1983):

Persönliche Mitteilung.

Gimeno, A. (1982):

Mycotoxin method for analysis of 14 mycotoxins in raw material, mixed feed, food products and animal tissues by thin layer chromatography.

Vortrag Mykologenkongreß München,

zitiert nach Schultz J. und R. Motz (1983)

Hebert, G.A., P.L. Pelham und B. Pittman (1973):

Determination of the optimal ammonium sulfate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse, and goat antisera.

Appl. Microbiol. 25, 26 - 36

Hunter, K.W., A.A. Brimfield, M. Miller, F.D. Finkelman und F.S. Chu (1985):

Preparation and characterization of monoclonal antibodies to the trichothecene mycotoxin T2.

Appl. Environ. Microbiol. 49, 168 - 172

Jagadeesan, V., C. Rukmini, M. Vdayaraghavan und P.G. Tulpule (1982):

Immune studies with T2-toxin: Effect of feeding and withdrawal in monkeys.

Fd. Cosmet. Toxicol. 20, 83 - 87

Joffe, A.Z. (1960):

Toxicity and antibiotic properties of some Fusaria.

Bull. Res. Council of Israel 8D, 81 - 95

Kosuri, N.R., E.B. Smalley und R.E. Nichols (1971):

Toxicologic studies of *Fus. tricinctum* (Corda) Snyder et Hansen from moldy corn.

Am. J. Vet. Res. 32, 1843 - 1850

Kriegleder, H. (1980):

Morphologische Befunde beim Meerschweinchen nach Verabreichung der Trichothecene Diacetoxyscirpenol und T2-Toxin.

Diss. med. vet., Universität München

Loeffler, W., R. Mauli, M.E. Ruesch und H. Stähelin (1965):

Anguidin and derivatives, new antibiotic and antitumoral products.

Chem. Abstr. 62, 5856d

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall (1951)

Protein measurement with the folinphenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265 - 274

Lutsky, I., N. Mor, B. Yagen und A.Z. Joffe (1978):

The role of T2-toxin in experimental alimentary toxic aleukia: A toxicity study in cats.

Toxic. Appl. Pharmac. 43, 111 - 124

Märtlbauer, E. und G. Terplan (1986):

Development of enzyme immunoassays for analysis of mycotoxins.

aus: Proceedings of the 2nd World Congress Foodborne Infections and Intoxications; Berlin, Mai 1986

Marasas, W.F.O., E.B. Smalley, P.E. Degurse, J.R. Bamburg und R.E. Nichols (1967):

Acute toxicity to rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) of a metabolite produced by the fungus *Fusarium tricinctum*.

Nature 214, 817 - 818

Marasas, W.F.O., J.R. Bamburg, E.B. Smalley, F.M. Strong, W.L. Ragland und P.E. Degurse (1969):

Toxic effects on trout, rats, and mice of T2-toxin produced by the fungus *Fusarium tricinctum* (Cd) Snyder et Hans.

Toxic. Appl. Pharmac. 15, 471 - 482

Matthews, J.G., D.S.P. Patterson, B.A. Roberts und
B.J. Shreeve (1977):

T2-toxin and haemorrhagic syndroms in cattles.
Vet. Rec. 101, 391

Mirocha, C.J., S.V. Pathre, B. Schauerhammer und
C.M. Christensen (1976):

Natural occurence of Fusarium toxins in feedstuff.
Appl. Environ. Microbiol. 32, 553 - 556

Nieschlag, E.H., H.K. Kley und K.H. Usadel (1974):

Production of steroid antisera in rabbits.

aus: Steroid Immunoassay Proceedings of the 5th Tenovus Work-
shop Cardiff, April 1974

Ed. by Cameron, E.D.H., S.G. Hillier und K. Griffiths

Ohtsubo, K. und M. Saito (1977):

Chronic effects of trichothecene toxins.

in: Rodricks, J.V., C.W. Hesseltine, M.A. Mehlmann:

Mycotoxins in animal and human health.

Pathotox Publishers Inc., Gustav Fischer Verlag

Palti, J. (1978):

Toxigenic Fusaria, their distribution and significance as
causes of disease in animal and man.

Acta Phytomed. 6, Beihefte zur Phytopathologischen Zeit-
schrift, Verlag Paul Parey, Berlin

Palyusik, M. und É. Koplikné-Kovács (1976):

Effect of feed containing T2- and F2-toxins on laying geese.

Vet. Bull. 46, Nr. 3711

Pestka, J.J., P.K. Gaur und F.S. Chu (1980):

Quantitation of aflatoxin B and aflatoxin B₁ antibody by
an enzyme-linked immunosorbent microassay.

Appl. Environ. Microbiol. 40, 1027 - 1031

Pestka, J.J., S.C. Lee, H.P. Lau und F.S. Chu (1981):
Enzyme-linked immunosorbent assay for T2-toxin.
JAOAC 64, 940 - 944

Peters, H., M.P. Dierich und K. Dose (1982):
Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of T2-toxin.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 1437 - 1441

Prentice, N. und A.D. Dickson (1968):
Emetic material associated with *Fusarium* species in cereal
grains and artificial media.
Biotechnol. Bioeng. 10, 413 - 427

Rosenstein, Y., C. Lafarge-Frayssinet, G. Lespinats,
F. Loisillier, P. Lafont und C. Frayssinet (1978):
Immunosuppressive activity of *Fusarium* toxins. Effects on
antibody synthesis and skin grafts of crude extracts, T2-toxin
and diacetoxyscirpenol.
Immun. 36, 111 - 117

Sato, N., J. Ueno und M. Enomoto (1975):
Toxicologic approaches to the toxic metabolites of *Fusaria*.
VIII. Acute and subacute toxicities of T2-toxin in cats.
Jpn. J. Pharmac. 25, 263 - 270

Schultz, J. und R. Motz (1983):
Zum Nachweis von T2-Toxin in Futtermitteln unter Verwendung von
Dünnschichtchromatographie und Biotest.
Mh. Vet. Med. 38, 777 - 780

Schuurs, A.H.W.M. und B.K. van Weemen (1977):
Review. Enzyme-immunoassay.
Clin. Chim. Acta 81, 1 - 40

- Siriwardana, T.M.G. und P. Lafont (1978):
New sensitive biological assay for 12,13-epoxytrichothecenes.
Appl. Environ. Microbiol. 35, 206 - 207
- Smalley, E.B. und F.M. Strong (1974):
Toxic trichothecenes.
in: Mycotoxins (I.F.H. Purchase Ed.), Elsevier, 199 - 228
- Speers, G.M., C.J. Mirocha, C.M. Christensen und
J.C. Behrens (1977):
Effects on laying hens of feeding corn invated by two species
of *Fusarium* and pure T2-mycotoxin.
Poul. Sci. 56, 98 - 102
- Stähelin, H., M.E. Kalberer-Rüsch, E. Signer und
S. Lazary (1968):
Über einige biologische Wirkungen des Cytostatikum Diacetoxyscirpenol.
Arzneimittel Fo. 18, 989 - 994
- Thompson, W.L. und R.W. Wannemacher (1984):
Detection and quantitation of T2-mycotoxin with a simplified
protein synthesis inhibition assay.
Appl. Environ. Microbiol. 48, 1176 - 1180
- Titan, S.L.F., G.S. Zhang und F.S. Chu (1984):
An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for T2-toxin in
biological fluids.
J. Fd. Protec. 47, 964 - 967
- Ueno, Y., M. Hosoya und Y. Ishikawa (1969):
Inhibitory effects of mycotoxins on the protein synthesis in
rabbits reticulocytes.
J. Biochem. 66, 419 - 422

Ueno, Y., Y. Ishikawa, A. Amakai, M. Nakajima, M. Saito, M. Enomoto und K. Ohtsubo (1970):

Comparative study on skin-necrotizing effect of scirpene metabolites of *Fusaria*.

Jpn. J. Exp. Med. 40, 33 - 38

Ueno, Y., K. Ishii, K. Sakai, S. Kanaeda, Y. Tsunoda, T. Tanaka und M. Enomoto (1972a):

Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*.

IV. Microbial Survey on "Bean Hulls Poisoning of Horses" with the isolation of toxic trichothecenes neosolaniol and T2-toxin of *Fusarium solani* M-1-1.

Jpn. J. Exp. Med. 42, 187 - 203

Ueno, Y., N. Sato, K. Ishii, K. Sakai und M. Enomoto (1972b):

Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*.

V. Neosolaniol, T2-toxin, butenolide, toxic metabolites of *Fus. sporotrichoides* NRRL 3510 and *Fus. poae* 3287.

Jpn. J. Exp. Med. 42, 461 - 472

Ueno, Y. (1977):

Trichothecenes: Overview address

in: Rodricks, J.V., C.W. Hesseltine, M.A. Mehlmann:

Mycotoxins in animal and human health

Pathotox Publishers Inc., Gustav Fischer Verlag

Weaver, G.A., H.J. Kurtz, C.J. Mirocha, F.Y. Bates und

J.C. Behrens (1978a):

Acute toxicity of the mycotoxin diacetoxyscirpenol in swine.

Can. Vet. J. 19, 267 - 271

Weaver, G.A., H.J. Kurtz, F.Y. Bates, M.S. Chi, C.J. Mirocha, C.J. Behrens und T.S. Robison (1978b):

Acute and chronic toxicity of T2-mycotoxin in swine.

Vet. Rec. 103, 531 - 535

Wyatt, R.D., B.A. Weeks, P.B. Hamilton und

H.R. Burmeister (1972):

Severe oral lesions in chickens caused by ingestion of dietary Fusariotoxin T2.

Appl. Microbiol. 24, 251 - 257

Wyatt, R.D., P.B. Hamilton und H.R. Burmeister (1973a):

The effects of T2-toxin in broiler chickens.

Poul. Sci. 52, 1843 - 1859

Wyatt, R.D., W.M. Colwell, P.B. Hamilton und

H.R. Burmeister (1973b):

Neural disturbances in chickens caused by dietary T2-toxin.

Appl. Microbiol. 26, 757 - 761

Yagen, B., A.Z. Joffe, P. Horn, N. Mor und J.J. Lutsky (1977):

Toxins from a strain involved in ATA.

in: Rodricks, J.V., C.W. Hesseltine, M.A. Mehlmann:

Mycotoxins in animal and human health.

Pathotox Publishers Inc., Gustav Fischer Verlag

Yates, S.G., H.L. Tookey, J.J. Ellis und H.J. Burkhardt (1968):

Mycotoxins produced by *Fusarium nivale* isolated from tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.).

Phytochemistry 7, 139 - 146

Abschließend danke ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Lebenslauf

Am 5. Juni 1955 wurde ich, Michael Leopold Böhm, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Hans Böhm und seiner Ehefrau Paula, geborene Körner, in Würzburg geboren.

Nach Besuch der Volksschule in Waldbüttelbrunn, Kreis Würzburg, von September 1961 bis Juli 1965 trat ich in das Röntgen-Gymnasium Würzburg ein und erlangte dort 1975 die allgemeine Hochschulreife.

Von Juli 1975 bis September 1976 leistete ich den Grundwehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Im Wintersemester 1976 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, das ich im Oktober 1982 mit dem Staatsexamen abschloß. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich im Dezember 1982.

Von April 1983 bis Februar 1986 war ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Hygiene und Technologie der Milch an der Universität München tätig.

